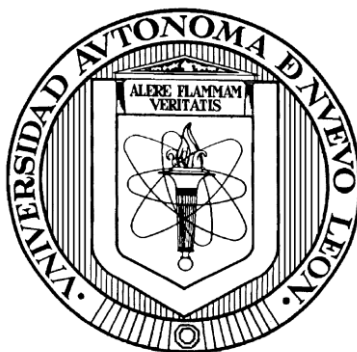


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**SÍNTESIS DE PORFIRINAS Y METALOPORFIRINAS NO SIMÉTRICAS
FUNCIONALIZADAS CON L-GLUTAMATO Y EVALUACIÓN DE SUS
PROPIEDADES FOTODINÁMICAS Y ANTICANCERÍGENAS.**

Por

EDER UBALDO ARREDONDO ESPINOZA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

Septiembre, 2014

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Ingeniería Genética y Genómica y Química Industrial de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

**“SÍNTESIS DE PORFIRINAS Y METALOPORFIRINAS NO SIMÉTRICAS
FUNCIONALIZADAS CON L-GLUTAMATO Y EVALUACIÓN DE SUS
PROPIEDADES FOTODINÁMICAS Y ANTICANCERÍGENAS”**

Revisión de la Tesis:

Dr. Isaías Balderas Rentería
Director de Tesis

Dra. Susana Thelma López Cortina
Co-Directora de Tesis

Dra. Yolanda Araceli Gracia Vázquez
Comité Tutorial

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Comité Tutorial

Dra. Ivonne Antonieta Camacho Mora
Comité Tutorial

Dr. Pablo Zapata Benavides
Revisor Externo

Dr. Gildardo Rivera Sánchez
Revisor Externo

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Sub-Directora de Estudios de Posgrado
Septiembre, 2014

**“SÍNTESIS DE PORFIRINAS Y METALOPORFIRINAS NO SIMÉTRICAS
FUNCIONALIZADAS CON L-GLUTAMATO Y EVALUACIÓN DE SUS
PROPIEDADES FOTODINÁMICAS Y ANTICANCERÍGENAS”**

Aprobado por Comité de Tesis:

Dr. Isaías Balderas Rentería
Presidente

Dra. Yolanda Araceli Gracia Vázquez
Secretario

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Primer Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavides
Segundo Vocal

Dr. Gildardo Rivera Sánchez
Tercer Vocal

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

Septiembre, 2014

RESUMEN

MC. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza **Fecha de Graduación: Septiembre 2014**
Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: SÍNTESIS DE PORFIRINAS Y METALOPORFIRINAS NO SIMÉTRICAS FUNCIONALIZADAS CON L-GLUTAMATO Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES FOTODINÁMICAS Y ANTICANCERÍGENAS.

Número de páginas: 130

**Candidato para el grado
de Doctor en Ciencias con Orientación en Farmacia**

Propósito y Método del Estudio: La terapia fotodinámica (TFD) requiere de tres componentes fundamentales, oxígeno, luz visible y un agente fotosensibilizador (FS's), cada componente es inocuo por sí solo, pero al combinarse producen agentes citotóxicos que pueden destruir las células tumorales. La TFD es un procedimiento mínimamente invasivo y una nueva y prometedora alternativa para combatir el cáncer.

Las porfirinas son agentes FS's empleados en la TFD. La naturaleza de los sustituyentes en posición meso, α y β en las porfirinas tienen efecto en sus características espectrales, fotofísicas y biológicas. Las porfirinas presentan afinidad por las células tumorales y absorben la luz en el rango del visible; sin embargo, presentan una limitante que es su alta hidrofobicidad. Este problema puede ser resuelto mediante la adición de sustituyentes hidrofílicos (azúcares, hidroxilos, sulfatos, fosfonatos, péptidos, entre otros). Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue realizar la síntesis y caracterización de tetraarilporfirinas no simétricas A_3B funcionalizadas con dimetil 2-aminopentanodioato y sin funcionalizar (derivadas de pirrol, *p*-metoxibenzaldehído y metil 4-formilbenzoato), además de sintetizar las metaloporfirinas correspondientes de cobre y zinc, para su posible aplicación en la terapia fotodinámica.

Contribuciones y Conclusiones: Se sintetizaron, purificaron y caracterizaron cuatro porfirinas no simétricas del tipo A₃B: NS1u, NS2u, NS1uf y NS2uf. Dos de ellas funcionalizadas con glutamato (NS1uf y NS2uf), así como las metaloporfirinas correspondientes de cobre y zinc. Se determinaron los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete ($\Phi\Delta$) de todos los compuestos con valores que van de 0.21 a 0.67. En general las metaloporfirinas de cobre presentaron los valores más bajos y las metaloporfirinas de zinc presentaron los valores más altos.

Los compuestos en el estudio presentaron resultados de fototoxicidad con valores de IC₅₀ que van de <0.01 a 6.5 μ M, la metaloporfirina NS2uf-Zn es la más fototóxica. Al comparar la actividad fototóxica entre las porfirinas del presente estudio, se puede observar que la funcionalización de las porfirinas con glutamato aumentó 100 veces la actividad fototóxica (NS1u (IC₅₀ 5 μ M), NS1uf (IC₅₀ 0.05 μ M) y NS2u (IC₅₀ 5.4 μ M), NS2uf (IC₅₀ 0.05 μ M)). Este aumento en la actividad puede ser atribuido a la disminución de la hidrofobicidad y al aumento del rendimiento cuántico de oxígeno singlete, dado por la funcionalización con glutamato.

Las metaloporfirinas NS1uf-Zn y NS2uf-Zn presentaron la mejor actividad fototóxica con valores de IC_{50} de 0.03 y $< 0.01 \mu M$, respectivamente. La funcionalización y la metalación mejoraron su actividad fototóxica. Los valores de fototoxicidad de las metaloporfirinas NS1uf-Zn y NS2uf-Zn se compararon contra el Photofrin® (IC_{50} 4.3 μM sobre células Hela) y el Foscan® (IC_{50} 0.0076 μM sobre células HTC 116), podemos mencionar que las metaloporfirinas NS1uf-Zn y NS2uf-Zn son más fototóxicas que el Photofrin® y actividad fototóxica similar al Foscan®. Por lo tanto estas moléculas podrían tener una potencial aplicación como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica.

FIRMA DEL ASESOR: _____.
Dr. Isaías Balderas Rentería

DEDICATORIA

A DIOS

A MI ESPOSA MÓNICA LOERA

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MIS ABUELOS

A MI FAMILIA POLÍTICA

YOU'LL NEVER WALK ALONE

AGRADECIMIENTOS

A la **Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L.** por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado y la presente investigación.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico.

Al **Dr. Isaías Balderas Rentería** mi asesor de tesis por su apoyo y confianza durante todo este tiempo y además por darme la oportunidad de trabajar a su lado así como compartir sus conocimientos conmigo.

A la **Dra. Susana Thelma López Cortina** mi asesora de tesis por su apoyo en la realización de la presente investigación.

A mi comité tutorial: **Dra. Yolanda Araceli Gracia Vázquez, Dra. María Elena Cantú Cárdenas y Dra. Ivonne Antonieta Camacho Mora** por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión de este trabajo.

A los profesores, Dr. Eugenio Hernández Fernández, Dra. Mónica A. Ramírez Cabrera, Dra. Patricia González Barranco, Dr. Xristo Zarate Kalfópulos, Dr. Omar González Santiago, Dra. Lucia Cantú Cárdenas, Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez, MC. Ma. Del Rosario González González, MC. Nancy Pérez Rodríguez, Dra. Perla Elizondo Martínez, Dra. Ma. Teresa Garza González, Dra. Ma. Del Rayo Camacho por su valioso apoyo en mi paso por el posgrado.

A mis compañeros del INGEN: Teresa Vargas, Jessica Gómez, Zulma P., Gonzalo, Karen, Issac Díaz, Oscar, Fabián, Enrique, Sandra, Raúl Favela, Ivette Aldama, Olivia Flores, Héctor Ramírez, Raúl Reyna, José Ángel Merino y Sonia Lozano, gracias por su amistad, ayuda, consejos y por todos los momentos que vivimos en el laboratorio.

A mis Compañeros del Lab. De Química Industrial: MC. Francisco Ávalos, MC. Mayra Hernández, MC. Saúl Ovalle, Dra. Sara Rodríguez, MC. Sofía Rodríguez, MC. Francisco Góngora, LQI. Carolina Martínez, MC. Erika, LQI. Luis Carlos, Luis Cazare, LQI. Ilse, Marco, Cristian, Karime, Angeles, Susana, Cynthia, Alba, Andy, Pablito, David, Annie, Jorge, gracias por su amistad y por todos los momentos que vivimos en el laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de Productos Naturales: Dr. Juan Manuel Favela, MC. Adriana Romo, MC. Adriana Hernández, MC. Aldo Clemente y a la Dra. Patricia Esquivel, gracias por su amistad.

A mis compañeros de generación del posgrado en Ciencias.

¡MUCHAS GRACIAS!

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
RESUMEN.....	V
DEDICATORIA.....	VIII
AGRADECIMIENTOS.....	IX
TABLA DE CONTENIDO.....	XI
LISTA DE TABLAS.....	XV
LISTA DE FIGURAS.....	XVII
LISTA DE ESQUEMAS.....	XXII
NOMENCLATURA.....	XXIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 EL CÁNCER.....	2
1.1.1. Genética y biología molecular del cáncer.....	2
1.1.2. Causas del cáncer.....	6
1.1.3 Terapia anticancerígena.....	8
1.2. TERAPIA FOTODINÁMICA.....	9
1.2.1. Fotosensibilizadores.....	9
1.2.2. Mecanismo de acción de la TFD.....	11
1.2.3. Distribución y localización celular de los FS y su impacto en la TFD.....	13
1.3. ANTECEDENTES.....	15
1.4. JUSTIFICACIÓN.....	20
1.5. HIPÓTESIS.....	21
1.6. OBJETIVOS.....	22
1.6.1. Objetivo general.....	22

1.6.2. Objetivos específicos.....	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN.....	25
2.1.1. Funcionalización del 4-formilbenzoato de metilo con 2-aminopentanodioato de dimetilo.....	25
2.1.2. Síntesis de las porfirinas.....	26
2.1.3. Metalación de las porfirinas.....	28
2.1.4. Purificación de los compuestos obtenidos.....	29
2.2. CARACTERIZACIÓN.....	30
2.2.1. Espectroscopia Ultravioleta-Visible.....	30
2.2.2. Resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C	30
2.3. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FOTODINÁMICAS.....	31
2.3.1. Rendimiento cuántico de oxígeno singlete.....	31
2.3.2. Fototoxicidad y citotoxicidad intrínseca in vitro por WST-1.....	32
2.3.3. Apoptosis determinada por la actividad de caspasa-3.....	33
2.3.4. Análisis de expresión génica diferencial (microarreglos de DNA).....	34
2.3.5 Manejo de residuos.....	37
3. RESULTADOS.....	38
3.1. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN.....	39
3.1.1. Funcionalización del 4-formil benzoato de metilo con 2-aminopentanodioato de dimetilo.....	39

3.1.2. Síntesis de las porfirinas.....	41
3.1.3. Metalación de las porfirinas.....	46
3.2. CARACTERIZACIÓN.....	50
3.2.1. Ácido 4-formil benzoico.....	50
3.2.1.1. Resonancia magnética nuclear ^1H	50
3.2.1.2. Resonancia magnética nuclear ^{13}C	51
3.2.2. 2-aminopentanodioato de dimetilo.....	53
3.2.2.1. Resonancia magnética nuclear ^1H	53
3.2.2.2. Resonancia magnética nuclear ^{13}C	54
3.2.3. 2-(4-formil benzamido) pentanodioato de dimetilo.....	56
3.2.3.1. Resonancia magnética nuclear ^1H	56
3.2.3.2. Resonancia magnética nuclear ^{13}C	58
3.2.4. Porphirinas.....	59
3.2.4.1. Porphirina NS1u RMN de ^1H	59
3.2.4.2. Porphirina NS2u RMN de ^1H	62
3.2.4.3. Porphirina NS1uf RMN de ^1H	65
3.2.4.4. Porphirina NS2uf RMN de ^1H	67
3.2.4.5. Espectroscopia UV-Vis de las porfirinas.....	70
3.2.5. Metaloporphirinas.....	71
3.2.5.1. Espectroscopia UV-Vis de las metaloporphirinas.....	71
3.3. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FOTODINÁMICAS.....	73

3.3.1. Rendimiento cuántico de oxígeno singlete.....	73
3.3.2. Fototoxicidad y citotoxicidad intrínseca <i>in vitro</i> por WST-1.....	76
3.3.2.1. Citotoxicidad intrínseca de las porfirinas.....	76
3.3.2.2. Citotoxicidad intrínseca de las metaloporfirinas.....	77
3.3.2.3 Fototoxicidad de las porfirinas.....	80
3.3.2.4. Fototoxicidad de las metaloporfirinas.....	81
3.3.2.5. Determinación de la IC ₅₀ de las porfirinas y metaloporfirinas...	84
3.3.3. Apoptosis determinada por la actividad de caspasa-3.....	85
3.3.4. Análisis de expresión génica diferencial (microarreglos de DNA).....	86
4. DISCUSIÓN.....	100
4.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN.....	101
4.2. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FOTODINÁMICAS.....	104
5. CONCLUSIONES.....	114
DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	116
REFERENCIAS.....	117

LISTA DE TABLAS

Tabla.	Página
1. Aldehídos usados para la obtención de las porfirinas.....	27
2. Picos máximos de absorción de las porfirinas.....	70
3. Picos máximos de absorción de las metaloporfirinas.....	72
4. Valores de rendimientos cuánticos de oxígeno singlete de las porfirinas y metaloporfirinas medidos en metanol.....	75
5. Citotoxicidad intrínseca de las porfirinas sobre células SiHa.....	76
6. Citotoxicidad intrínseca de las metaloporfirinas de cobre sobre células SiHa.....	78
7. Citotoxicidad intrínseca de las metaloporfirinas de zinc sobre células SiHa.....	78
8. Fototoxicidad de las porfirinas sobre células SiHa.....	80
9. Fototoxicidad de las metaloporfirinas de cobre sobre células SiHa.....	82
10. Fototoxicidad de las metaloporfirinas de zinc sobre células SiHa.....	82
11. IC ₅₀ de las porfirinas y las metaloporfirinas sobre células SiHa.....	84
12. Valores de absorbancia a 405 nm, indican la actividad de la enzima caspasa-3.....	85

13. Algunas vías metabólicas y los genes sobreexpresados para cada vía.

(tratamiento con la porfirina NS2uf-Cu).....90

14. Algunas vías metabólicas y los genes reprimidos para cada vía.

(tratamiento con la porfirina NS2uf-Cu).....94

15. Algunas vías metabólicas y los genes sobreexpresados para cada vía.

(tratamiento con la porfirina NS2uf-Zn).....96

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Alteraciones genéticas implicadas en el cáncer.....	3
2. Diagrama de Jablonski de las transiciones electrónicas asociadas a los fotosensibilizadores.....	12
3. Mecanismo de acción de la TFD.....	13
4. Tetrapirroles aromáticos.....	15
5. Fotosensibilizadores aprobados para la terapia fotodinámica.....	17
6. Porfirinas sintetizadas por Banfi y cols.....	18
7. Porfirinas sintetizadas por Králová y cols.....	18
8. Cromatografía en placa de la purificación del ácido 4-formil benzoico.....	40
9. Cromatografía en placa de la purificación del 2-(4-formil benzamido) pentanodioato de dimetilo.....	41
10. Cromatografía en placa de las reacciones de síntesis de las porfirinas NS1u (a) y NS2u (b).....	42
11. Cromatografía en placa de la purificación de las porfirinas NS1u (a) y NS2u (b).....	44
12. Cromatografía en placa de la síntesis de las porfirinas NS1uf y NS2uf.....	45

13. Cromatografía en placa de la purificación de las porfirinas	
NS1uf y NS2uf.....	46
14. Cromatografía en placa de la purificación de las metaloporfirinas	
Cu-NS1u (a) y Cu-NS2u (b).....	47
15. Cromatografía en placa de la purificación de las metaloporfirinas	
Cu-NS1uf (a) y Cu-NS2uf (b).....	48
16. Cromatografía en placa de la purificación de las metaloporfirinas	
Zn-NS1u (a) y Zn-NS2u (b).....	49
17. Cromatografía en placa de la purificación de las metaloporfirinas	
Zn-NS1uf (a) y Zn-NS2uf (b).....	50
18. Espectro de RMN ^1H del ácido 4-formil benzoico.....	51
19. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H del	
ácido 4-formil benzoico.....	51
20. Espectro de RMN ^{13}C del ácido 4-formil benzoico.....	52
21. Asignación de las señales del espectro de RMN ^{13}C del	
ácido 4-formil benzoico.....	52
22. Espectro de RMN ^1H del 2-aminopentanodioato de dimetilo.....	53
23. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H	
2-aminopentanodioato de dimetilo.....	54

24. Espectro de RMN ^{13}C del 2-aminopentanodioato de dimetilo.....	55
25. Asignación de las señales del espectro de RMN ^{13}C del 2-aminopentanodioato de dimetilo.....	55
26. Espectro de RMN ^1H del 2-(4-formil benzamido) pentanodioato de dimetilo....	57
27. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H del 2-(4-formil benzamido) pentanodioato de dimetilo.....	57
28. Espectro de RMN ^{13}C del 2-(4-formil benzamido) pentanodioato de dimetilo...	58
29. Asignación de las señales del espectro de RMN ^{13}C del 2-(4-formil benzamido) pentanodioato de dimetilo.....	59
30. Espectro de RMN ^1H de la porfirina NS1u.....	60
31. Ampliación del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS1u.....	61
32. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS1u.....	62
33. Espectro de RMN ^1H de la porfirina NS2u.....	63
34. Ampliación del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS2u.....	64
35. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS2u.....	65
36. Espectro de RMN ^1H de la porfirina NS1uf.....	66
37. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS1uf.....	67
38. Espectro de RMN ^1H de la porfirina NS2uf.....	69
39. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS2uf.....	69

40. Espectros de absorción UV-Vis de las porfirinas.....	71
41. Espectros de absorción UV-Vis de las metaloporfirinas de cobre.....	72
42. Espectros de absorción UV-Vis de las metaloporfirinas de zinc.....	73
43. Comparación de las velocidades de fotodegradación del DPBF en metanol, usando las porfirinas y metaloporfirinas como fotosensibilizadores y la p-TPPH como referencia.....	74
44. Citotoxicidad intrínseca de las porfirinas.....	77
45. Citotoxicidad intrínseca de las metaloporfirinas de cobre.....	79
46. Citotoxicidad intrínseca de las metaloporfirinas de zinc.....	79
47. Fototoxicidad de las porfirinas.....	81
48. Fototoxicidad de las metaloporfirinas de cobre.....	83
49. Fototoxicidad de las metaloporfirinas de zinc.....	83
50. Valores de absorbancia a 405 nm, indican la actividad de la enzima caspasa-3.....	86
51. RNA's obtenidos y electro-forados en un gel de agarosa al 1%.....	87
52. Chip de DNA.....	87
53. Genes reprimidos y sobreexpresados con un z-score ± 2 DE. a) tratamiento con la porfirina NS2uf-Cu, b) tratamiento con la porfirina NS2uf-Zn.....	88

54. Vías metabólicas mostradas por DAVID, dónde los genes sobreexpresados tienen implicación (tratamiento con la porfirina NS2uf-Cu).....	89
55. Vías metabólicas mostradas por DAVID, dónde los genes reprimidos tienen implicación (tratamiento con la porfirina NS2uf-Cu).....	93
56. Vías metabólicas mostradas por DAVID, dónde los genes sobreexpresados tienen implicación (tratamiento con la porfirina NS2uf-Zn).....	95
57. Genes sobreexpresados en la vía metabólica MAPK (tratamiento con NS2uf-Zn).....	99

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema.	Página
1. Funcionalización del 4-formilbenzoato de metilo con 2-aminopentanodiató de dimetilo.....	26
2. Síntesis de la porfirinas por el método de Lindsey.....	28
3. Metalación de las porfirinas.....	29

NOMENCLATURA

NS1u	5, 10, 15-Tris(4-metoxifenil)-20(4-metoxycarbonilfenil)-porfirina
NS2u	5, 10, 15-Ttris(4-metoxycarbonilfenil)-20(4-metoxifenil)-porfirina
NS1uf	5,10,15-Tris(4-metoxifenil)-20(p-(dimetil-2-aminopentanodioato)-carbonilfenil)-21H,23H-porfirina
NS2uf	5,10,15-Tris(p-(dimetil-2-aminopentanodioato)-carbonilfenil)-20(4-metoxifenil)-21H,23H-porfirina
NS1u-Zn	Zinc (II) 5, 10, 15-Tris(4-metoxifenil)-20(4-metoxycarbonilfenil)-porfirinato
NS1u-Cu	Cobre (II) 5, 10, 15-Tris(4-metoxifenil)-20(4-metoxycarbonilfenil)-porfirinato
NS2u-Zn	Zinc (II) 5, 10, 15-Ttris(4-metoxycarbonilfenil)-20(4-metoxifenil)-porfirinato
NS2u-Cu	Cobre (II) 5, 10, 15-Ttris(4-metoxycarbonilfenil)-20(4-metoxifenil)-porfirinato
NS1uf-Zn	Zinc (II) 5,10,15-Tris(4-metoxifenil)-20(p-(dimetil-2-aminopentanodioato)-carbonilfenil)-21H,23H-porfirinato
NS1uf-Cu	Cobre (II) 5,10,15-Tris(4-metoxifenil)-20(p-(dimetil-2-aminopentanodioato)-carbonilfenil)-21H,23H-porfirinato
NS2uf-Zn	Zinc (II) 5,10,15-Tris(p-(dimetil-2-aminopentanodioato)-carbonilfenil)-20(4-metoxifenil)-21H,23H-porfirinato
NS2uf-Cu	Cobre (II) 5,10,15-Tris(p-(dimetil-2-aminopentanodioato)-carbonilfenil)-20(4-metoxifenil)-21H,23H-porfirinato
TDF	Terapia fotodinámica

FS	Fotosensibilizador
Abs	Absorbancia
OD	Densidad óptica (OD por sus siglas en inglés)
LDL	Lipoproteína de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés)
DCC	N,N'Diciclohexilcarbodiimida
DCU	Dicicloxilurea
DMAP	4-dimetilaminopiridina
Agua DEPC	Agua tratada con Dietil pirocarbonato
PBS	Buffer de fosfatos
NaCl	Cloruro de sodio
BF ₃ •O(Et) ₂	Trifluoruro de boro eterato
TFA	Ácido trifluoroacético (TFA por sus siglas en inglés)
N ₂	Nitrógeno
CO ₂	Dióxido de carbono
DDQ	2,3 -dicloro-5,6 -diciano-p-benzoquinona
CH ₂ CL ₂	Diclorometano
t.a.	Temperatura ambiente
MeOH	Metanol
AcOEt	Acetato de etilo
WST-1	4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno

MEM	Medio de cultivo Mínimo Esencial Medio
SDS	Dodecil sufalto de sodio (sodium dodecyl sulfate)
SFB	Suero fetal bovino
SiO ₂	Gel de sílice
TLC	Cromatografía en placa fina (por sus siglas en inglés)
UV-Vis	Ultravioleta visible
δ	Desplazamiento cuántico
ppm	Partes por millón
m	Multiplicidad
J	Constante de acoplamiento
Hz	Hertz
g	Gramo
mg	Miligramo
μ g	Microgramo
ng	Nanogramo
N	Normalidad
M	Molaridad
μ M	Concentración micromolar
L	Litro
ml	Mililitro
μ l	Microlitro

CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
°C	Grados Celsius
h	Horas
min	Minutos
s	Segundos
rpm	Revoluciones por minuto
UV	Ultra violeta
Fig	Figura
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
miRNA's	RNA's pequeños con funciones regulatorias

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 EL CÁNCER

El cáncer es un amplio grupo de enfermedades crónico degenerativas que pueden afectar cualquier parte del organismo, la principal característica de esta enfermedad es la proliferación continua e incontrolada de las células dañadas [1, 2].

El cáncer representa una problemática mundial que tan sólo en el año 2012 fue causante de 8.2 millones de defunciones, se estima que las muertes por este padecimiento sigan aumentando y alcancen la cifra de 13.1 millones para el año 2030 [3]. En nuestro país los tumores malignos ocuparon el tercer lugar entre las principales causas de defunción con 73,240 muertes en el año 2012 [4].

1.1.1 Genética y biología molecular del cáncer.

El cáncer surge de la acumulación de alteraciones estructurales o funcionales en el ácido desoxirribonucleico (DNA) celular. El desarrollo del cáncer es un proceso multifactorial en el cual las células se transforman progresivamente en “malignas” a través de la acumulación de alteraciones genéticas (figura 1).

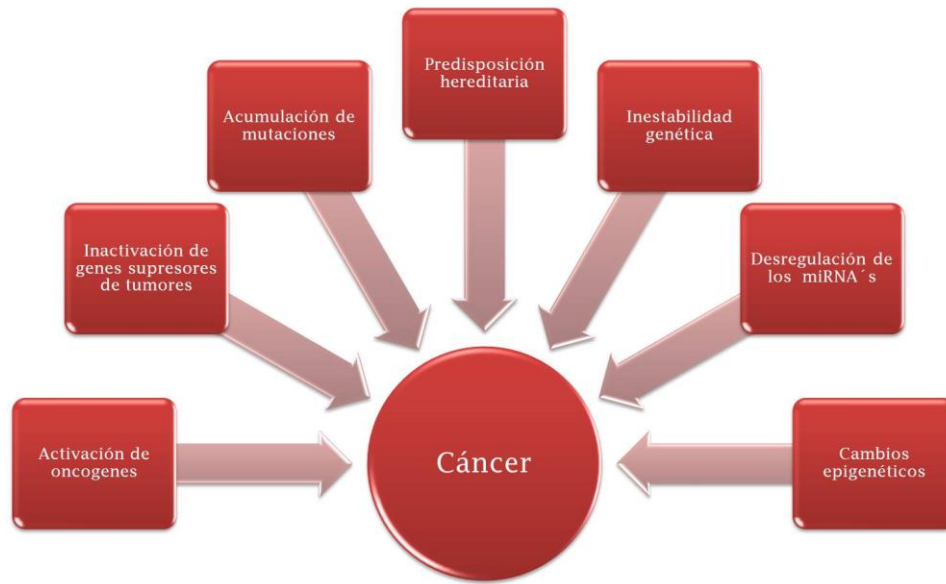


Figura 1. Alteraciones genéticas implicadas en el cáncer.

- **Activación de oncogenes.** Los oncogenes son versiones alteradas de genes que codifican proteínas cuya función es regular los procesos de proliferación y diferenciación celular, los oncogenes desencadenan el descontrol en los procesos celulares y por consiguiente el crecimiento descontrolado de las células neoplásicas [5].
- **Inactivación de los genes supresores de tumores.** Los genes supresores de tumores se encuentran en las células normales y controlan el ciclo celular evitando el crecimiento excesivo. En muchos tumores, estos genes están ausentes o inactivados, por lo cual no pueden llevar a cabo su función, lo que contribuye a la proliferación anormal de las células tumorales [6, 7].
- **Acumulación de mutaciones.** La alteración en un solo gen suele no ser suficiente para dar lugar al cáncer. Para la progresión hacia la malignidad y la invasión son necesarias más mutaciones. Por lo tanto, el riesgo de desarrollar

cáncer depende no solo de las mutaciones que inician la tumorigénesis, sino también de las mutaciones posteriores que conducen a la progresión del tumor y diseminación de la enfermedad [8].

■ **Predisposición hereditaria.** El cáncer hereditario se desarrolla en pacientes portadores de polimorfismos de predisposición presentes en sus células germinales. La proporción directa de cánceres hereditarios en la población es pequeña. En general se estima que alrededor de 1% de todos los cánceres son verdaderamente hereditarios [9].

■ **Inestabilidad genética.** Las mutaciones en los genes de estabilidad genética (fidelidad de la replicación, reparación del DNA, segregación cromosómica, vigilancia de daños y genes de respuestas celulares como apoptosis) pueden desencadenar diversas manifestaciones, tales como mutaciones puntuales en otros genes, inestabilidad de los microsatélites y la pérdida de la heterocigosidad [10].

■ **Desregulación de los micro-RNAs.** Los miRNAs son reguladores de procesos biológicos fundamentales como el desarrollo, la proliferación celular, la apoptosis, el metabolismo, la muerte celular, entre otros. Existe evidencia que los miRNAs están expresados de forma aberrante en el cáncer [11].

■ **Cambios epigenéticos.** Los cambios epigenéticos regulan muchos procesos celulares, la alteración o la pérdida de su control, puede causar enfermedades como el cáncer [12].

Las células cancerosas presentan alteraciones en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular normal y lo llevan a cabo por los siguientes mecanismos moleculares:

- **La resistencia a los fármacos.** Las células cancerosas son capaces de evadir la acción de los fármacos antineoplásicos mediante los siguientes mecanismos: bloqueo de la entrada de los fármacos, bombeo de los fármacos hacia el exterior o inactivación enzimática de los mismos [13].
- **Alteraciones en la apoptosis.** Las células tumorales a menudo tienen defectuosas las vías de señalización apoptóticas, lo que provoca una expansión de las células neoplásicas. Estos defectos pueden hacer que las células cancerígenas resistan al sistema inmunológico (debido a que los mecanismos efectores de las células T citotóxicas y las asesinas naturales no son efectivos en estas células) y también resistan a la quimioterapia y la radioterapia (debido a que estos tratamientos matan principalmente por inducción de apoptosis, evidentemente ésta no es la única vía por la que actúa la quimioterapia, por consiguiente la resistencia depende del estímulo, el tipo de célula, el ambiente del tumor y muchos otros factores) [14].
- **Sobreexpresión de telómeros.** Los telómeros se acortan con cada división celular y el número de divisiones que la célula puede experimentar se correlaciona con la longitud de los telómeros. Esta función de los telómeros los relaciona con el desarrollo de las células tumorales, en muchos tumores se encuentra sobreexpresada la enzima telomerasa que es la encargada de replicarlos [15].

- **Metástasis.** Es un importante mecanismo de las células cancerígenas que les ayuda a diseminarse a otros tejidos y provocar la formación de tumores. La mayoría de las muertes por cáncer se deben al desarrollo de metástasis [16].
- **Angiogénesis tumoral.** Es la proliferación de una red de nuevos vasos sanguíneos que penetran dentro del tumor, proporcionando nutrientes y oxígeno y removiendo productos de desecho [17].

1.1.2. Causas del cáncer.

Las alteraciones implicadas en el cáncer son resultado de la interacción entre los factores genéticos inherentes en la persona y los agentes ambientales que pueden ser: físicos, químicos o biológicos. Los agentes exógenos que causan cáncer se denominan carcinógenos, estos se han identificado mediante estudios en experimentos *in vivo* e *in vitro*, además de análisis epidemiológicos de la frecuencia de padecer cáncer en la población en general [3].

Muchos cánceres humanos están asociados a la exposición a carcinógenos químicos. Generalmente hay un período largo de tiempo entre los primeros eventos que incluyen la exposición inicial a los carcinógenos, la aparición de daños en el DNA y la fijación de las mutaciones y la posterior aparición del tumor. Los carcinógenos químicos pueden ocasionar los siguientes daños al DNA: intercalación en las bases de DNA, rearrreglos cromosómicos, deleciones, rompimientos en la cadena de DNA y formación de aductos, entre otros [18].

Entre los factores físicos destacan las radiaciones ionizantes como los rayos X y rayos gamma, entre otros y las radiaciones no ionizantes como los rayos ultravioleta. Los factores físicos pueden producir mutaciones en el DNA, rompimientos en el DNA ya sea de una sola hebra, de ambas, o entrecruzamiento entre ellas; también pueden presentarse transposiciones y deleciones, estos daños pueden conducir a la formación de cáncer [19]. La principal alteración que produce la radiación UV sobre el DNA es la dimerización de pirimidinas, lo que causa distorsión en la doble hélice del DNA impidiendo la correcta replicación y transcripción. Otras alteraciones provocadas por la luz UV son: entrecruzamiento de proteínas y DNA, rompimientos de cadena sencilla y formación de radicales libres generados por sensibilizadores endógenos como las riboflavinas o las porfirinas. Los radicales libres generados juegan un papel importante en el daño celular, dando lugar a la peroxidación lipídica y a la oxidación de las bases del DNA [20].

Las infecciones por virus, bacterias y parásitos son reconocidas como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer en seres humanos. A nivel mundial, las infecciones virales se relacionan con el 15-20% de todos los cánceres. Algunas infecciones pueden causar la inflamación a largo plazo, suprimir el sistema inmunológico de la persona, o afectar directamente el DNA [21, 22].

El envejecimiento es otro factor en el desarrollo del cáncer. La incidencia de cáncer aumenta con la edad, muy probablemente porque con la edad aumenta la acumulación de factores de riesgo de ciertos tipos específicos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia de los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad [23].

1.1.3 Terapia anticancerígena.

El programa de tratamiento contra el cáncer depende del tipo y del estadio del mismo. La mayoría de los planes de tratamiento incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinaciones de ellos. Algunos otros comprenden la terapia hormonal o terapia biológica. Los efectos adversos son frecuentes ya que los tratamientos para el cáncer generalmente dañan células y tejidos sanos. Los efectos adversos dependen fundamentalmente del tipo y extensión del tratamiento. Es posible que tales efectos indeseables no sean los mismos aun en pacientes que reciben tratamientos similares y los efectos pueden cambiar de una sesión de tratamiento a otra [24].

■ **Quimioterapia.** La mayoría de los medicamentos antineoplásicos destruyen las células, alterando la síntesis o la función de los ácidos nucleicos (DNA o RNA), también pueden actuar sobre una o varias fases del ciclo celular o sobre los mecanismos de control de la proliferación celular [25].

■ **Radioterapia.** Es un tratamiento para el cáncer que consiste en radiación de energía elevada (radiación ionizante) dirigidos específicamente al tumor. Esta radiación daña el material genético presente en las células cancerosas, lo que las destruye e impide su diseminación. Puesto que la radiación se distribuye específicamente en la región del tumor (tratamiento local), los efectos sobre las células sanas se reducen a un mínimo [26].

■ **Cirugía.** Ofrece posibilidades de cura para muchos tipos de cáncer, sobre todo aquellos que no se han diseminado a otra parte del cuerpo y se encuentran en etapas tempranas del desarrollo del tumor de ahí la importancia del diagnóstico oportuno [27].

■ **Inmunoterapia.** Esta terapia se puede clasificar en específica y no específica, la primera actúa contra una célula cancerosa o un antígeno de la misma, los anticuerpos monoclonales y las vacunas contra el cáncer son dos tipos de inmunoterapia específica, mientras que la inmunoterapia no específica actúa estimulando el sistema inmune de manera general, sólo aumentando la eficiencia del sistema inmunológico. Las interleucinas y los interferones son ejemplos de inmunoterapia no específica [28].

1.2. TERAPIA FOTODINÁMICA

La terapia fotodinámica (TFD) es una terapia emergente en el tratamiento del cáncer, ésta ha sido aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de América para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas, vejiga, esófago, queratosis actínica y degeneración macular asociada a la edad [29].

La TFD destruye las células cancerígenas mediante la generación fotoquímica de especies reactivas de oxígeno, estas especies se generan por la interacción de oxígeno con un agente fotosensibilizador (FS) excitado por la irradiación de luz visible [29].

1.2.1. Fotosensibilizadores.

Los primeros FS's aprobados para su uso fueron una forma purificada de derivados de hematoporfirina (Hp) que consiste en una mezcla de porfirinas. Aunque estos agentes son utilizados en la práctica clínica, presentan una serie de desventajas como una gran extensión de fotosensibilidad en la piel y poca selectividad entre las células cancerosas y las normales [30].

De esta forma es como aparece la segunda generación de agentes fotosensibilizadores, entre los que se cuentan: clorinas, porfirinas, bacterioclorinas y ftalocianinas. Éstos presentan una ventaja significativa pues poseen una mejor absorción de la luz a una mayor longitud de onda, lo que incrementa la profundidad a la cual puede aplicarse la terapia y también los fotosensibilizadores de segunda generación presentan cierta selectividad por las células tumorales [30]. Algunos FS's de segunda generación han sido conjugados o empaquetados en moléculas acarreadoras que pueden liberar específicamente a los FS's en los tejidos tumorales, es así como surgen los agentes fotosensibilizadores de tercera generación. Las moléculas acarreadoras incluyen anticuerpos monoclonales, lisosomas y polímeros [31].

Un buen agente fotosensibilizador debe cumplir con las siguientes propiedades fotodinámicas:

- Alto rendimiento cuántico para ser generadores efectivos de oxígeno singulete y especies reactivas de oxígeno.
- Absorber a longitudes de onda entre 650-800 nm para una máxima penetración de la luz a través del tejido.
- Toxicidad mínima en ausencia de luz y no producir metabolitos tóxicos.
- Una óptima absorción, distribución, metabolismo y excreción.
- Una formulación simple y estable, capaz de ser soluble en fluidos biológicos lo que permite una administración por vía intravenosa.
- Presentar una mayor acumulación en el tejido tumoral.
- Localización subcelular en orgánulos que inducen apoptosis como las mitocondrias.
- No presentar efectos mutagénicos o carcinogénicos [31].

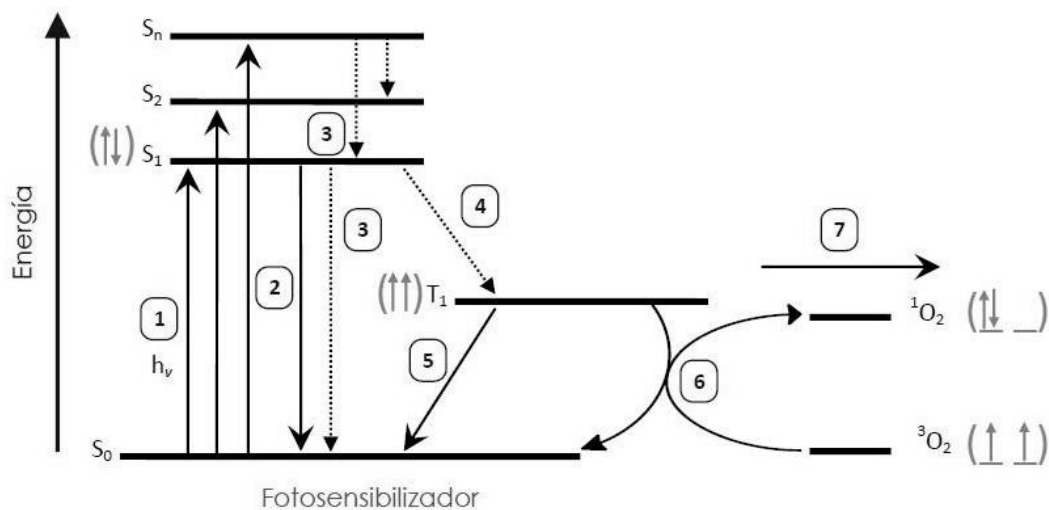
1.2.2. Mecanismo de acción de la TFD.

Como ya se mencionó anteriormente la TFD se basa en la captación selectiva del fotosensibilizador por parte de las células cancerígenas, seguida de la irradiación con luz de baja energía a una determinada longitud de onda para que penetre en el tejido y active al FS y éste a su vez transfiera su energía al oxígeno conduciendo a la formación de especies reactivas de oxígeno que conducen a la muerte celular.

La forma en la cual el FS produce las especies reactivas de oxígeno es la siguiente, una vez que el FS es irradiado, pasa de un estado basal (S_0) a un estado electrónicamente excitado (S_1) de tiempo de vida corto [$\sim 10^{-6}$ s], posteriormente ocurre un cruzamiento intersistema, lo cual involucra la inversión del espín, convirtiendo al FS en el estado triplete (T_1 , 10^{-2} s) con alta eficiencia (figura 2) [31].

En ambientes donde el oxígeno se encuentra presente, el FS puede dirigirse principalmente hacia un proceso fotoquímico tipo II, en el cual se involucra una transferencia de energía entre el estado triplete excitado del FS y el estado basal del oxígeno (3O_2) produciendo un estado excitado altamente reactivo y con un tiempo de vida corto, el oxígeno singulete (1O_2) (figura 2). El oxígeno singulete es la especie más relacionada con los efectos citotóxicos de la TFD [31].

El proceso de tipo I involucra un sistema de transferencia de electrones donde el estado triplete del FS interactúa con el sustrato biológico produciendo la formación de radicales, los cuales al interactuar con moléculas de oxígeno pueden originar diversas especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo), tal como se muestra en el número 7 del diagrama (Figura 2) [31].



1. Absorción de la luz; 2. Fluorescencia; 3. Conversión interna; 4. Cruzamiento intersistema; 5. Fosforescencia; 6. Producción de oxígeno singlete (fotoproceso tipo II) 7. Transferencia electrónica (fotoproceso tipo I)

Figura 2. Diagrama de Jablonski de las transiciones electrónicas asociadas a los fotosensibilizadores.

El 1O_2 puede matar directamente a las células tumorales por la inducción de necrosis y apoptosis, también puede causar la destrucción de la microvasculatura del tumor y además produce una respuesta inflamatoria importante que atrae a los leucocitos como las células dendríticas y neutrófilos (figura 3) [32, 33].

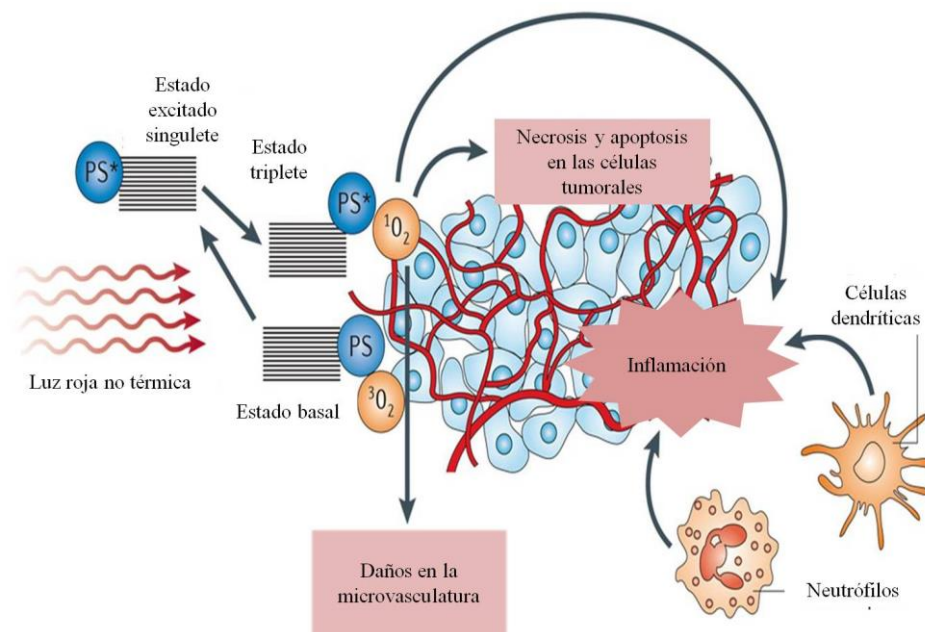


Figura 3. Mecanismo de acción de la TFD.

1.2.3. Distribución y localización celular de los FS y su impacto en la TFD.

Los mecanismos por los cuales los FS se distribuyen preferencialmente hacia las células tumorales no son comprendidos completamente. Se cree que las propiedades del tejido tumoral pueden contribuir a esta selectividad, éstas incluyen un pH del líquido intersticial ligeramente ácido debido a la presencia del ácido láctico, la presencia de macrófagos y el elevado número de receptores de la lipoproteína de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés). Muchos fármacos fotosensibilizadores presenta una alta afinidad por las LDL en plasma por lo cual, esto implicaría una biodistribución dirigida por las LDL [34, 35].

La estructura anormal del estroma del tumor que se caracteriza por un gran espacio intersticial, el sistema vascular agrietado, el drenaje linfático comprometido, una gran cantidad de colágeno (donde el FS puede unirse) y una gran cantidad de lípidos (generalmente los FS's son hidrofóbicos) también favorecen la distribución selectiva de los FS's [34, 35].

Debido al corto tiempo de vida (< 0.04 microsegundos) y al limitado radio de acción ($< 0.02\mu\text{m}$) del $^1\text{O}_2$, el daño en los tejidos está estrechamente relacionado con la localización de los FS's. La mayoría de los FS's se dirigen selectivamente a nivel intracelular a los lisosomas, membranas y mitocondrias. En particular el daño sobre las mitocondrias es uno de los daños más importantes en la TFD ya que esto puede producir la muerte celular programada (apoptosis), permitiendo también la liberación de citocromo C y otros factores mitocondriales al citosol que pueden desencadenar la apoptosis [34, 35].

Los cambios inducidos en la membrana plasmática y en las membranas de los organelos celulares por la TFD pueden desencadenar efectos de largo alcance, este daño implica la transducción de señales por lo que se aumenta la expresión de las proteínas de respuesta al estrés, así como los genes que regulan la apoptosis y posiblemente la sobreexpresión de citocinas [34, 35].

1.3. ANTECEDENTES.

Las porfirinas comprenden una clase de moléculas con funciones claves en muchos procesos biológicos, como los son el transporte de oxígeno, transferencia de electrones, conversión de energía, catálisis, entre otros. Las porfirinas consisten en un macrociclo formado por cuatro unidades de pirrol unido por cuatro puentes metino entre los pirroles, el macrociclo contiene 22 electrones π de los cuales 18 se encuentran conjugados cumpliendo con la regla de Hückel para la aromaticidad [36].

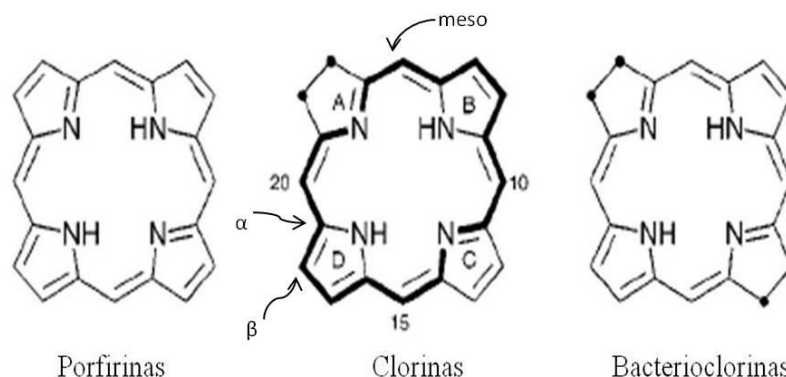


Figura 4. Tetrapirroles aromáticos.

Las porfirinas son agentes FS's empleados en la TFD. La naturaleza y posición de los sustituyentes en posición *meso*, α y β en las porfirinas tienen efecto en sus características espectrales, fotofísicas y biológicas. Las porfirinas presentan afinidad por las células tumorales y absorben la luz en el rango del visible; sin embargo, presentan una limitante, su alta hidrofobicidad. Este problema puede ser resuelto mediante la adición de sustituyentes hidrofílicos (azúcares, hidroxilos, sulfatos, fosfonatos, péptidos, entre otros) [37-41].

Cabe señalar que la era actual de la TFD comenzó en el año de 1960 con los estudios de L. Lipson y S. Schwartz, ellos utilizaron el derivado de la hematoporfirina (Hp) para la detección de tumores [42, 43], tuvieron que pasar doce años para que Diamond y cols., [44] demostraran la fototoxicidad del derivado de Hp contra gliomas en estudios *in vitro* e *in vivo*. En el año de 1976 Kelly y cols., [45] proponen la estructura activa de la Hp y ese mismo año Weishaupt y cols., [46] identifican al oxígeno singulete como agente fototóxico. En el año de 1978 Dougherty y cols., [47] trataron los tumores de piel con un derivado de Hp, durante la siguiente década MaCaughan y cols., extendieron el procedimiento para tratar cáncer de esófago, cabeza y cuello, próstata, mama, entre otros [48, 49].

Después de dos décadas de trabajos, en el año de 1993 una mezcla de monómeros, dímeros y oligómeros de ésteres de dihematoporfirina llamada comercialmente Photofrin® es aprobada en Canadá para el tratamiento de cáncer de vejiga y tres años más tarde, en Estados Unidos de Norteamérica para el tratamiento de tumores obstructivos en el esófago. Hoy en día existen otros fotosensibilizadores aprobados para la terapia fotodinámica (figura 5), Levulan® (prodroga de protoporfirina IX; 630 nm, DUSA Pharmaceuticals, Inc.), Metvix® (prodroga de protoporfirina IX; 630 nm, PhotoCure ASA.), Foscan® (clorina, 652 nm, Biolitec AG) Laserphyrin® (clorina, 664 nm, Meiji Seika Kaisha, Ltd.) y Visudyne® (benzoporfirina, 693 nm, Novartis Pharmaceuticals) [35].

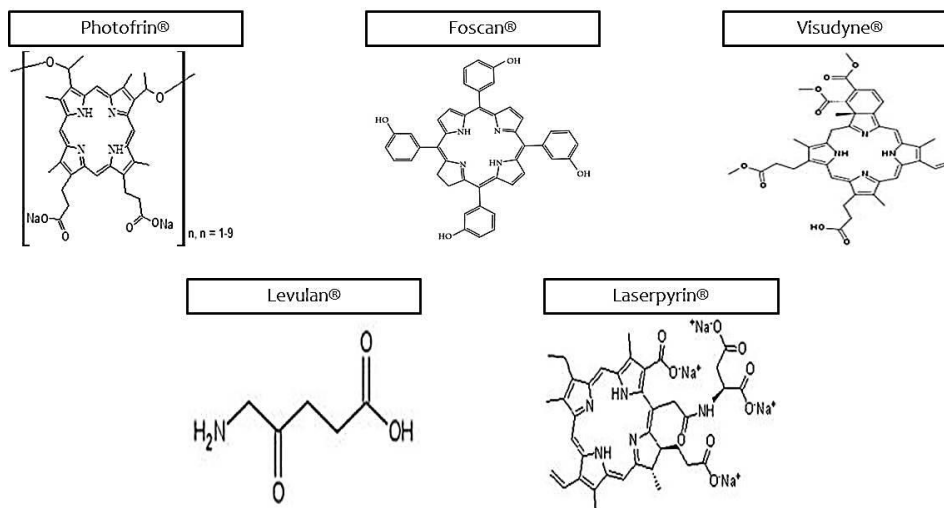


Figura 5. Fotosensibilizadores aprobados para la terapia fotodinámica.

Otras porfirinas han sido estudiadas desde la síntesis, la actividad fototóxica de las porfirinas así como sus características fotodinámicas con el objetivo de obtener mejores fotosensibilizadores [37, 50, 51], Banfi y cols., en 2004 sintetizaron porfirinas tomando como base el anillo de la tetraaril porfirina; el objetivo de este estudio fue evaluar si estos agentes FS's presentaban mejor penetrabilidad en los tejidos neoplásicos y una mayor actividad fotodinámica (figura 6). La actividad fue medida en una línea celular de adenocarcinoma de colon humano. La mayoría de estos compuestos presentaron una mayor actividad comparada contra el Photofrin® y la muerte celular se produjo principalmente por apoptosis [50].

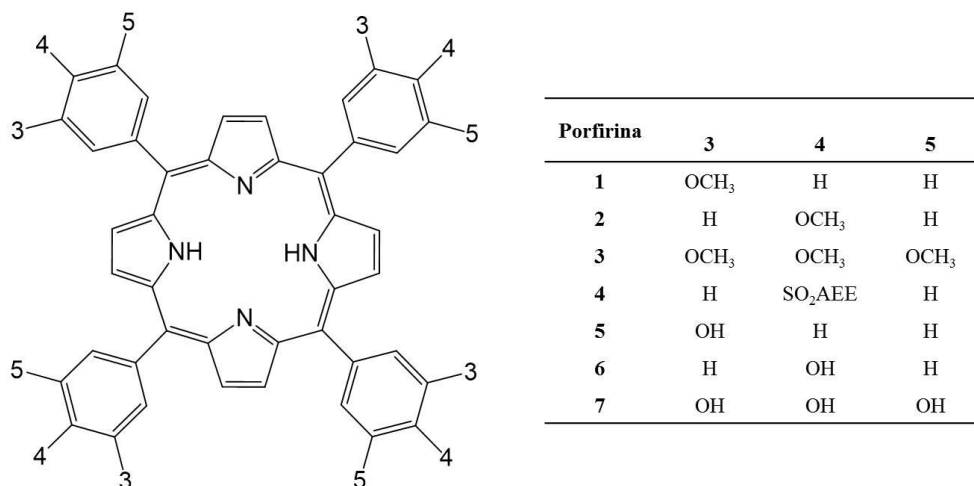


Figura 6. Porfirinas sintetizadas por Banfi y cols.

Králová y cols., en 2008 estudiaron sustituyentes hidrofílicos (glicoles) para mejorar la solubilidad en agua de los FS's, además probaron sus propiedades fototóxicas con resultados alentadores. Otros autores han utilizado diferentes sustituyentes hidrofílicos (ácidos carboxílicos, aminoácidos, sulfonatos, aminas y fenoles, entre otros) mejorando así su hidrofiliidad (figura 7) [37-41].

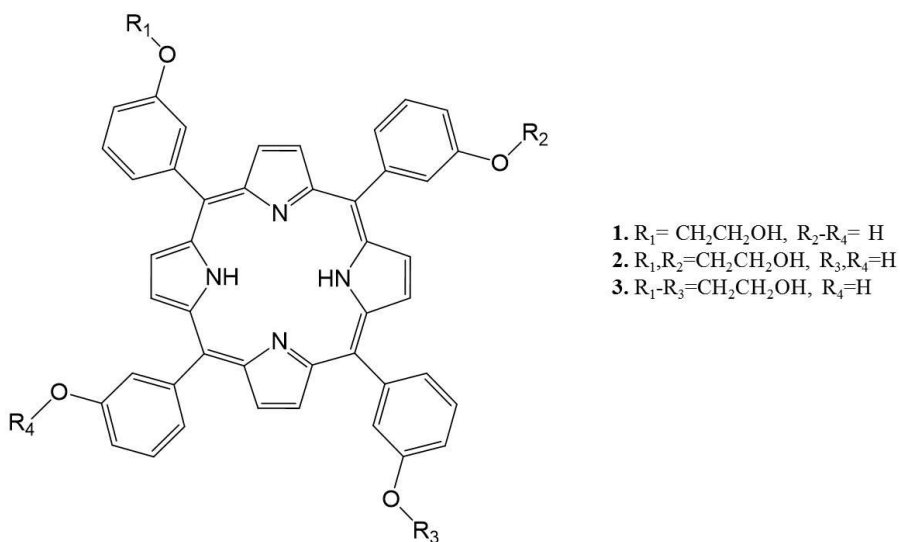


Figura 7. Porfirinas sintetizadas por Králová y cols.

Otra opción para mejorar las propiedades de los agentes FS's es la formación de complejos con metales, los cuales se alojan en el anillo tetrapirrónico consiguiendo con ello aumentar el tiempo de vida del estado triplete y promover el cruce intersistemas de los FS's. Los principales metales usados son los metales de transición, aunque también se han utilizado Aluminio, Silicio y Estaño, entre otros [52].

1.4. JUSTIFICACIÓN

La TFD es una alternativa prometedora en el tratamiento contra el cáncer; esta terapia ha sido probada en esquemas terapéuticos contra cáncer de pulmón de células no pequeñas, vejiga, esófago, queratosis actínica y degeneración macular asociada a la edad. Como ventajas de la TFD se pueden mencionar las siguientes: los agentes FS's muestran selectividad hacia las células cancerosas; el efecto fototóxico es localizado ya que solo se produce en el lugar que es irradiado minimizando con ello los efectos secundarios; la terapia puede ser aplicada en repetidas ocasiones pues no presenta efectos mutagénicos ya que no actúa sobre DNA; induce una respuesta inflamatoria que conduce al desarrollo de una reacción importante del sistema inmune y además puede ser combinada con otros tipos de tratamientos contra el cáncer.

Como ya se mencionó anteriormente las porfirinas son uno de los agentes FS's más promisorios para la TFD por sus características ya descritas, además existen nuevas estrategias propuestas para el mejoramiento de sus propiedades fotodinámicas, por lo que la obtención de mejores FS's es importante para ayudar en el avance de la TFD.

1.5. HIPÓTESIS

“Las metaloporfirinas funcionalizadas con L-glutamato presentan mejores propiedades fotodinámicas y anticancerígenas que sus respectivas porfirinas”

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. Objetivo general.

Sintetizar y caracterizar porfirinas y metaloporfirinas no simétricas funcionalizadas con L-glutamato y evaluar sus propiedades fotodinámicas y anticancerígenas.

1.6.2. Objetivos específicos.

- Sintetizar porfirinas y metaloporfirinas funcionalizadas con L-glutamato.
- Caracterizar los compuestos obtenidos.
- Determinar el rendimiento cuántico de oxígeno singlete.
- Evaluar la actividad fototóxica y citotóxica de los compuestos en estudio.
- Determinar la presencia de apoptosis después del tratamiento con los compuestos más citotóxicos.
- Determinar la expresión génica diferencial de las células después del tratamiento con la porfirina más activa.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo las porfirinas fueron obtenidas por síntesis química, realizando primero la funcionalización del benzaldehído con L-glutamato, para después sintetizar las porfirinas funcionalizadas y no funcionalizadas por el método descrito por Lindsey y cols., [53], por último se formaron complejos con metales para buscar mejorar sus propiedades fotofísicas. Después se realizó la determinación de las propiedades fotodinámicas de todas las porfirinas obtenidas.

Utilizamos la línea celular de cáncer de cérvix (células SiHa) obtenida de The American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, E.U.A.), con un número de catálogo ATCC: HTB-35, para los ensayos de citotoxicidad intrínseca y actividad fototóxica.

Los reactivos utilizados en este proyecto se adquirieron de las siguientes compañías: Roche (Indianapolis, IN, E.U.A.), Invitrogen (Carlsbal, CA, E.U.A.), CTR Scientific (Monterrey, N.L., México), Desarrollo de Especialidades Químicas S.A. de C.V. (Monterrey, N.L., México), SIGMA-ALDRICH (Saint Louis, MO, E.U.A) y BIO BASIC INC. (Markham, Ontario, Canadá).

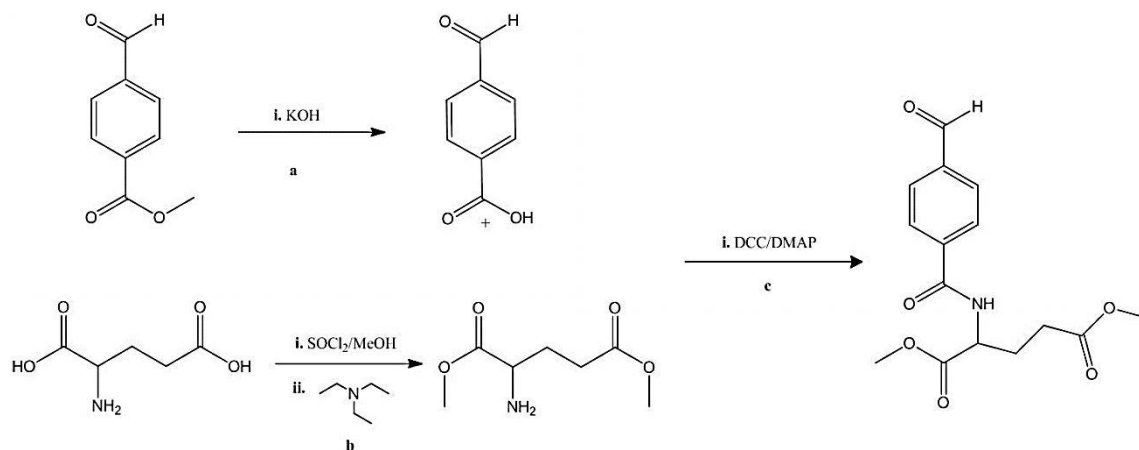
2.1. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN

2.1.1. Funcionalización del 4-formilbenzoato de metilo con 2-aminopentanodioato de dimetilo.

El 4-formil benzoato de metilo fue hidrolizado para obtener el ácido 4-formil benzoico (esquema 1a). 6 mmol del 4-formil benzoato de metilo se disolvieron en 40 ml de metanol y 11 mmol de hidróxido de potasio se disolvieron en 10 ml de agua, las soluciones se mezclaron y se dejaron en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas.

Para funcionalizar el benzaldehído con el L-glutamato fue necesario esterificar los dos grupos carboxilo del ácido glutámico para evitar la polimerización (esquema 1b). En la primera reacción 7 mmol de ácido glutámico se disolvieron en 30 ml de metanol después se le adicionaron 10 mmol de cloruro de tionilo y la reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 18 horas, en la siguiente reacción se eliminó el clorhidrato, 5 mmol del producto fueron disueltos en 50 ml de acetato de etilo, después se le adicionaron 5 mmol de trietilamina y se agitó por 4 horas a temperatura ambiente.

Finalmente se realizó el acoplamiento (esquema 1c), 6.6 mmol de ácido 4-formil benzoico y 10 mmol del 2-aminopentanodioato de dimetilo se colocaron en un matraz en atmósfera inerte de nitrógeno, vía cánula se transfirieron 6.6 mmol de N,N'Diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 1.2 mmol de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) disueltos en 40 ml de diclorometano seco y se dejó en agitación durante 20 horas a temperatura ambiente.



Esquema 1. Funcionalización del 4-formilbenzoato de metilo con 2-aminopentanodioato de dimetilo.

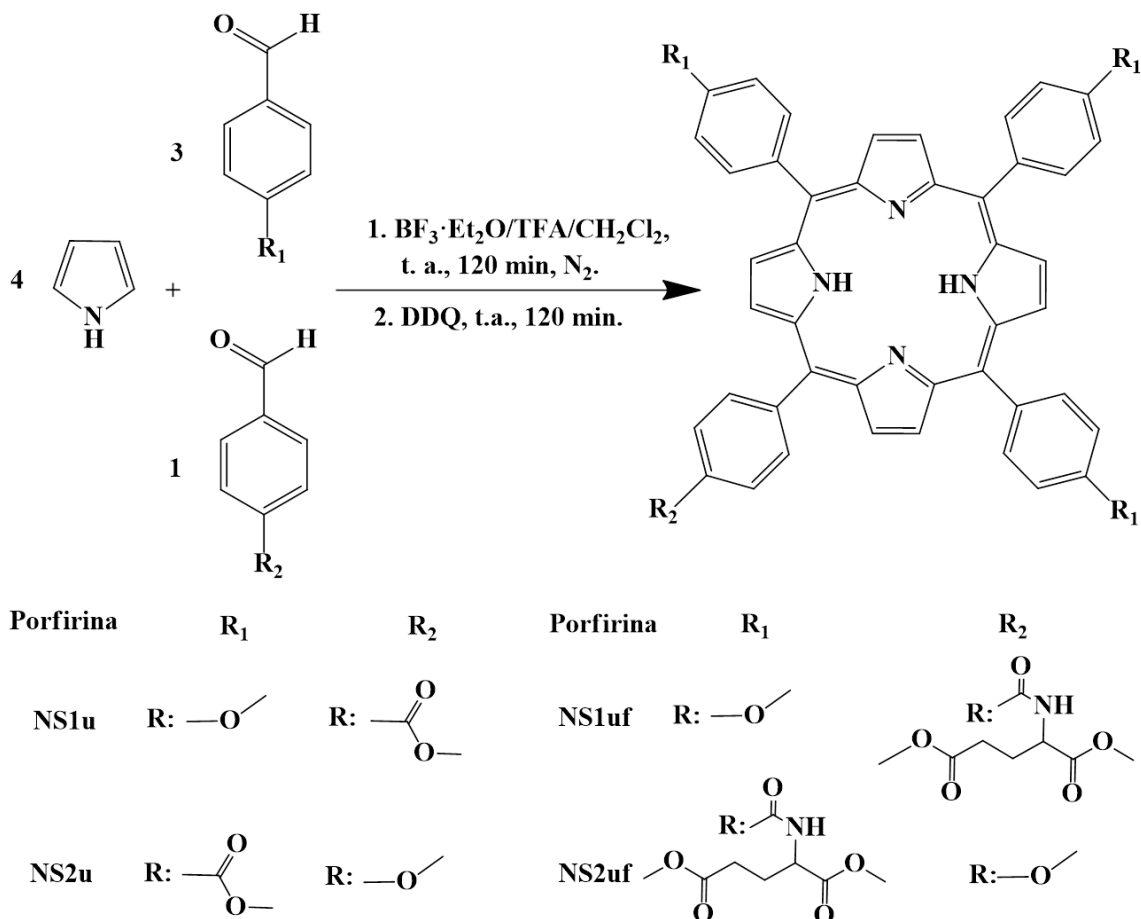
2.1.2. Síntesis de las porfirinas.

La síntesis de las porfirinas se realizó siguiendo el método descrito por Lindsey y cols., [53]. Las porfirinas fueron sintetizadas partiendo de pirrol (5 mmol) y la mezcla de aldehídos en proporción 1:1. Los aldehídos se usaron en una proporción 3:1, 3.5 mmol y 1.5 mmol, para cumplir la proporción con el pirrol. La reacción se llevó a cabo en diclorometano. En la tabla 1 se muestran los aldehídos usados para la obtención de la porfirinas.

Tabla 1. Aldehídos usados para la obtención de las porfirinas.

Porfirina	Aldehídos	
	3.5 mmol	1.5 mmol
NS1u	<i>p</i> -metoxi-benzaldehído	<i>p</i> -formil benzoato de metilo
NS2u	<i>p</i> -formil benzoato de metilo	<i>p</i> -metoxi-benzaldehído
		2-(4-formil benzamido)
NS1uf	<i>p</i> -metoxi-benzaldehído	pentanodioato de dimetilo
	2-(4-formil benzamido)	
NS2uf	pentanodioato de dimetilo	<i>p</i> -metoxi-benzaldehído

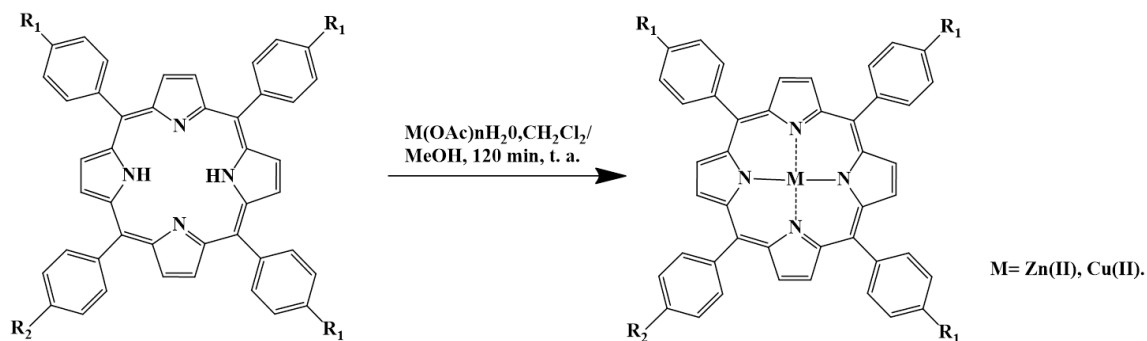
Las reacciones se realizaron en presencia de $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{Et})_2$ (1.2×10^{-2} mmol) y TFA (4.5 mmol), en agitación y en atmósfera inerte (N_2) a temperatura ambiente por 2 h, para la obtención del porfirinógeno. Finalmente, se adicionó 2,3 -dicloro-5,6 -diciano-*p*-benzoquinona (DDQ) (0.251 mmol) y se mantuvo la reacción por 2 h para oxidar el porfirinógeno y obtener las porfirinas correspondientes (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis de las porfirinas por el método de Lindsey.

2.1.3. Metalación de las porfirinas.

Las porfirinas fueron metaladas con Cu(II) y Zn(II) (esquema 3) de la siguiente manera: 0.1 mmol de la porfirina correspondiente se disolvieron en 10 ml de cloroformo. Por otra parte se disolvieron 0.2 mmol del acetato del metal en 10 ml de metanol. Las dos soluciones fueron mezcladas y después se agitó por 120 min a temperatura ambiente. Finalmente, el solvente fue evaporado y las porfirinas fueron purificadas por cromatografía en columna.



Esquema 3. Metalación de las porfirinas.

2.1.4. Purificación de los compuestos obtenidos.

A todas las reacciones se les evaporó el solvente una vez concluida cada una. Todos los productos fueron purificados por cromatografía en columna teniendo como fase estacionaria gel de sílice (SiO_2), para lo cual fue necesario realizar pruebas en cromatografía en placa fina (TLC por sus siglas en inglés) para determinar el eluyente a utilizar, buscando lograr una mayor separación entre las manchas.

La altura y ancho de la columna, así como la cantidad de gel de sílice con el que se empacó, se determinó en función de la cantidad de muestra a purificar y la separación observada entre las manchas en TLC.

2.2. CARACTERIZACIÓN.

2.2.1. Espectroscopia Ultravioleta-Visible.

Se determinó el espectro de absorción UV-Vis (350-750 nm) de los compuestos en estudio en un espectrofotómetro modelo Lambda-12s (Perkin Elmer). Esto con la finalidad de identificar su presencia ya que éstos presentan un patrón característico, una banda intensa llamada Soret a ~420 nm y cuatro bandas Q entre 480-800 nm para el caso de las porfirinas. En las metaloporfirinas se presenta una banda Soret a ~420 nm y dos bandas Q entre 480-800 nm, la ausencia de dos bandas Q es debido a la simetría rectangular que introduce el metal.

2.2.2. Resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .

El espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Carbono-13 se realizó con la finalidad de caracterizar e identificar los compuestos en estudio, estos se obtuvieron en un equipo de 500MHz modelo Varian-NMR System (AGILENT). Este análisis proporcionó información relevante con respecto a los hidrógenos presentes en cada compuesto como: desplazamiento químico (δ , ppm), multiplicidad (m), constantes de acoplamiento (J) y la cantidad de protones. La RMN de carbono-13 proporcionó información del tipo de carbonos presentes en la molécula.

2.3. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FOTODINÁMICAS.

2.3.1. Rendimiento cuántico de oxígeno singulete.

Se determinaron los rendimientos cuánticos de oxígeno singulete con el método de iluminación en el estado estacionario, se comparan las velocidades de consumo de un actinómetro eficiente aceptor de $^1\text{O}_2$ de rendimiento cuántico conocido en el solvente de trabajo, en presencia de un fotosensibilizador de referencia y el compuesto en estudio. Se utilizó el 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF por sus siglas en inglés) como actinómetro, la 5,10,15,20-tetra(4-hidroxifenil)-porfirina (*p*-TPPH por sus siglas en inglés) como fotosensibilizador de referencia con un rendimiento cuántico de 0.56 en metanol el solvente a utilizar [54].

La determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singulete (Φ_Δ) se realizó como sigue: se colocaron 2.5 ml de metanol con 1 μl de ácido acético y se adicionó la cantidad adecuada del compuesto en estudio hasta alcanzar una densidad óptica de 1.00 ± 0.02 en su banda Soret. Después se añadieron alícuotas del 1,3-difenilisobenzofurano en acetonitrilo (25 μl) hasta una densidad óptica de 1.00 ± 0.02 a 410 nm. La solución fue irradiada con luz visible. Finalmente se determinó la densidad óptica a 410 nm en un espectrofotómetro modelo Génesys 20 (TERMO SPECTRONIC) a diferentes tiempos (25, 50, 75 y 100 s).

Al graficar la absorbancia del actinómetro en función del tiempo, la pendiente de este gráfico es la constante de velocidad experimental k_{expREF} o k_{exp} según se utilice el sensibilizador de referencia o los compuestos en estudio. La razón entre estas constantes de velocidad corresponde a la razón de los rendimientos cuánticos (de $\Phi\Delta$ porfirinas en función del $\Phi\Delta^{\text{REF}}$) cuando los experimentos se realizan bajo las mismas condiciones. A continuación se muestra la fórmula para determinar los rendimientos cuánticos.

$$\Phi\Delta^{\text{porfirina}} = \Phi\Delta^{\text{REF}} \frac{k_{\text{exp porfirina}}}{k_{\text{exp REF}}}$$

Donde:

$\Phi\Delta^{\text{porfirina}}$, es el rendimiento cuántico de oxígeno singulete de la porfirina

$\Phi\Delta^{\text{REF}}$, es el rendimiento cuántico de oxígeno singulete de la referencia (*p*-THPP)

$k_{\text{exp porfirina}}$, es la constante de velocidad experimental de la porfirina

$k_{\text{exp REF}}$, es la constante de velocidad experimental de la referencia (*p*-THPP)

2.3.2. Fototoxicidad y citotoxicidad intrínseca *in vitro* por WST-1.

La actividad fototóxica fue determinada en células SiHa (ATCC: HTB-35). Las células se disociaron con tripsina-EDTA para posteriormente resuspenderlas en medio de cultivo MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Se colocaron aproximadamente 5,000 células por pozo en una placa de 96 pocillos y se incubó 24 horas a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂ en una incubadora con CO₂ modelo MCO-17AC (INCUSAFE SANYO). Se añadieron 100 µl con la concentración deseada del compuesto a analizar y posteriormente se incubó 24 horas a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂.

Terminado este periodo, las células fueron irradiadas con luz visible por 2 h con una lámpara (ALTLED 35W) y después se incubaron 24 h a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂. Enseguida se reemplazó el sobrenadante por 100 µl de medio MEM fresco y después se añadieron 10 µl del reactivo WST-1 [2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio] y se incubó por 2 horas a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂ para finalmente medir la densidad óptica a 450 nm con un lector de microplacas modelo ELx800 (BIOTEK).

Como control positivo se utilizó tritón X-100 al 1% en PBS, como control negativo se usó el cultivo sin ningún tratamiento y como blanco de reacción medio MEM y WST-1, también se realizó un control del solvente usado (isopropanol/diclorometano en proporción 2:1). La citotoxicidad intrínseca se determinó igual que la fototoxicidad solo que la irradiación fue omitida.

Las diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar se prepararon partiendo de un stock de 2000 µM en diclorometano. Las concentraciones probadas fueron las siguientes: 10, 5, 1, 0.1 y 0.01 µM.

2.3.3. Apoptosis determinada por la actividad de caspasa-3.

Las células SiHa fueron ajustadas a una densidad celular de 500,000 células/ml. Tres mililitros de esta suspensión se pasaron a una caja de cultivo y se incubaron por 24 h a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂. Después de este periodo se agregó el compuesto de estudio (NS1uf, NS2uf, NS1uf-Zn y NS2uf-Zn) y la podofilotoxina como control positivo a una concentración final de 10 µM, las células sin tratamiento fueron usadas como control negativo.

El cultivo fue incubado por 24 horas a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂. Posteriormente las células fueron irradiadas con luz visible por 2 h con una lámpara (ALTLED 35W) e incubadas por 6 h a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂. Las células fueron despegadas de la caja de cultivo mediante tratamiento con tripsina, y resuspendidas en 1 ml de PBS para después centrifugarlas y retirar el sobrenadante. Enseguida se agregaron 100 µl de buffer de lisis 1X a las células y posteriormente se incubaron en hielo por 20 min para después centrifugar la muestra a 14,000 rpm por 15 min.

El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo de 1.5 ml y se determinó la cantidad de proteína presente en cada muestra usando el método de Bradford [55], después se realizó una dilución de los extractos a para obtener una concentración de 50 µg de proteína por 50 µl. Posteriormente se agregaron 50 µl del buffer de reacción 2X, seguido de 5 µl del substrato DEVD-pNA y se incubó por 2 h a 37 °C. Finalmente se realizaron las lecturas de absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas modelo ELx800 (BIOTEK).

2.3.4. Análisis de expresión génica diferencial (microarreglos de DNA).

Los microarreglos de DNA son una herramienta útil para investigar los mecanismos de acción de los fármacos. Se requieren de dos condiciones experimentales, la población tratada y la población no tratada para determinar la expresión génica diferencial y poder observar los genes sobreexpresados o reprimidos. Las diferencias presentes en el nivel de expresión de cada gen es determinado por el número de copias de RNA mensajeros existentes en las muestras [56].

El estudio se realizó de la siguiente manera, se trataron las células SiHa con la porfirina NS2uf-Zn y NS2uf-Cu a una concentración de 10 μ M y se utilizaron células sin tratamiento para la comparación de la expresión génica, después del tratamiento las células se incubaron por 4 h, seguido de este tiempo se les realizó una extracción de RNA convencional, posteriormente se sintetizó el DNA complementario marcándose con los fluoróforos correspondientes. El cDNA fue hibridado en el microarreglo, después de la hibridación el microarreglo fue escaneado.

El RNA fue extraído de manera convencional usando el reactivo Trizol®. La extracción se realizó a partir de una pastilla con aproximadamente 1.5 millones de células, se añadieron 500 μ l de reactivo de Trizol®, después de 2 min se añadieron 200 μ l de cloroformo y se dejó reposar por 3 min, se centrifugaron las muestras por 8 min a 14,000 rpm, la fase acuosa se pasó a un nuevo tubo y el RNA fue precipitado con 500 μ l de isopropanol, se centrifugó 10 min a 14,000 rpm y se lavó con 500 μ l de etanol al 70%, se centrifugó 5 min a 8,000 rpm para eliminar el etanol y después de dejar secar el RNA fue resuspendido en 50 μ l de agua DEPC [57]. Las muestras de RNA se corrieron en un gel de agarosa al 1% para identificar la integridad del RNA. Los RNAs fueron cuantificados en un Biofotómetro (Eppendorf), también se determinó la relación de la densidad óptica (DO) 260/280 si los valores se encuentran entre 1.8 - 2.0 se considera un RNA de calidad.

Para la obtención de aminoalil-cDNA, se utilizó el kit Chipshot de Promega, siguiendo el Protocolo Promega (Z3604) [58]. El marcado del RNA fue realizado mediante la síntesis del DNA complementario usando desoxinucleótidos T marcados con una molécula fluorescente Alexafluor® 555 y 647 una molécula fluorescente para cada tipo de muestra (tratada/no tratada). Finalmente, se purificó el cDNA marcado para eliminar el desoxinucleótido fluorescente no incorporado al cDNA. El cDNA (50 µl) fue hibridado con las sondas presentes en el microarreglo, el cDNA se colocó sobre el microarreglo y se cubrió con un cubreobjetos para permitir que la solución impregnara todo el microarreglo. Se recomienda que los microarreglos sean colocados en cámaras húmedas para evitar la evaporación [56].

Se empleó un lector de microarreglos que utiliza un láser para excitar las moléculas fluorescentes presentes en el cDNA y se obtuvieron dos imágenes una para cada uno de los fluoróforos, una para el fluoróforo AlexaFluor® 555 (rojo) y otra para el fluoróforo AlexaFluor® 647 (verde). Se ajustó la intensidad del láser y la sensibilidad de la cámara o de los fotomultiplicadores de tal forma que ambas imágenes dieron valores semejantes de fluorescencia total. Una vez obtenidas estas imágenes, se combinaron para obtener un aspecto visual del microarreglo [56].

Para la obtención de los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia contenidas en el microarreglo, se realizó el análisis de las imágenes obtenidas mediante el uso del software GenArise. Los genes sobreexpresados e inhibidos con un z-score mayor o menor a ± 2 desviación estándar según sea el caso, son considerados significativos para el análisis bioinformático.

Con ayuda del programa DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) se determinó en qué posibles rutas metabólicas están involucrados los genes sobre expresados e inhibidos en el ensayo del microarreglo [56, 59].

2.3.5 Manejo de residuos.

Se utilizaron los siguientes solventes para la purificación de las porfirinas: metanol, acetato de etilo, hexano, isopropanol, estos fueron dispuestos en el colector C, el diclorometano usado se dispuso en el colector D. Los cultivos usados fueron esterilizados en autoclave y dispuestos en el contenedor bolsa roja para residuos biológico-infecciosos.

Listado de contenedores usados:

Contenedor C. Tóxicos e inflamables, aminos, solventes orgánicos no halogenados.

Contenedor D. Tóxicos e inflamables, aminos, solventes orgánicos halogenados.

Contenedor bolsa roja. Residuos de cultivos celulares biológico-infecciosos.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN.

3.1.1. Funcionalización del 4-formil benzoato de metilo con 2-aminopentanodioato de dimetilo.

En la primera reacción el 4-formil benzoato de metilo fue hidrolizado para obtener el ácido 4-formil benzoico (esquema 1a, página 26), durante la reacción se observó la formación de sales de etóxido de potasio por lo cual al terminar la reacción fueron eliminadas de la siguiente forma, primero se llevó el pH a 2 con una solución al 20 % de HCl en metanol para favorecer la precipitación y posteriormente se filtró a vacío para eliminarlas.

En la figura 8 se puede observar una cromatografía en placa fina del ácido 4-formil benzoico (R_f 0.13) y comparado contra el 4-formil benzoato de metilo (R_f 0.91) revelada con luz ultravioleta. Finalmente las fracciones que contenían el producto fueron concentradas y rotaevaporadas obteniendo 846 mg de un sólido color beige. El rendimiento de la reacción de hidrólisis del 4-formil benzoato de metilo fue de 92.7% (846 mg).

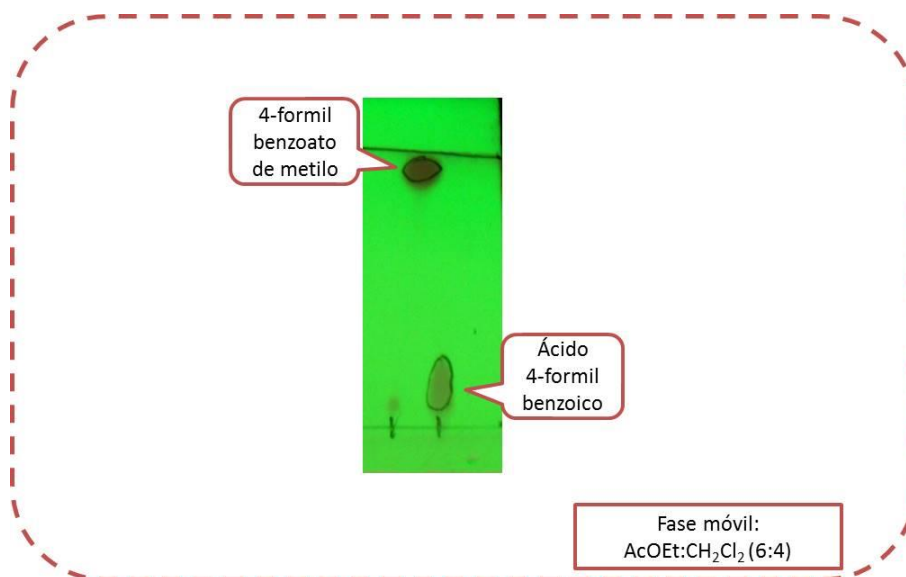


Figura 8. Cromatografía en placa de la purificación del ácido 4-formil benzoico.

En la reacción de esterificación del ácido L-glutámico para obtener el clorhidrato de 2-aminopentanodioato de dimetilo (esquema 1b, página 26), el crudo de reacción obtenido fue rotaevaporado y lavado con éter etílico, se obtuvieron 1.1 g con un rendimiento de 78%. El clorhidrato fue eliminado al adicionar trietil amina para obtener el 2-aminopentanodioato de dimetilo, al concluir la reacción se observó un precipitado de color blanco el cual fue eliminado por filtración a vacío, el filtrado obtenido fue rotaevaporado, se obtuvieron 437 mg con un rendimiento de 66.8%.

Se observó la precipitación de N,N'-diciclohexilurea (DCU) en la reacción de acoplamiento (esquema 1c, página 24), la DCU fue eliminada por filtración a vacío y el filtrado fue rotaevaporado y sometido a purificación por medio de cromatografía en columna.

En la figura 9 se puede observar una cromatografía en placa fina del 2-(4-formilbenzamido) pentanodioato de dimetilo con un R_f de 0.69 y comparado contra el ácido 4-formil benzoico (R_f 0.13) revelado con luz ultravioleta. Finalmente las fracciones que contenían el producto fueron concentradas y rotaevaporadas obteniendo 673 mg de un sólido color beige. El rendimiento de la reacción de acoplamiento del ácido 4-formil benzoico fue de 33% (673 mg).

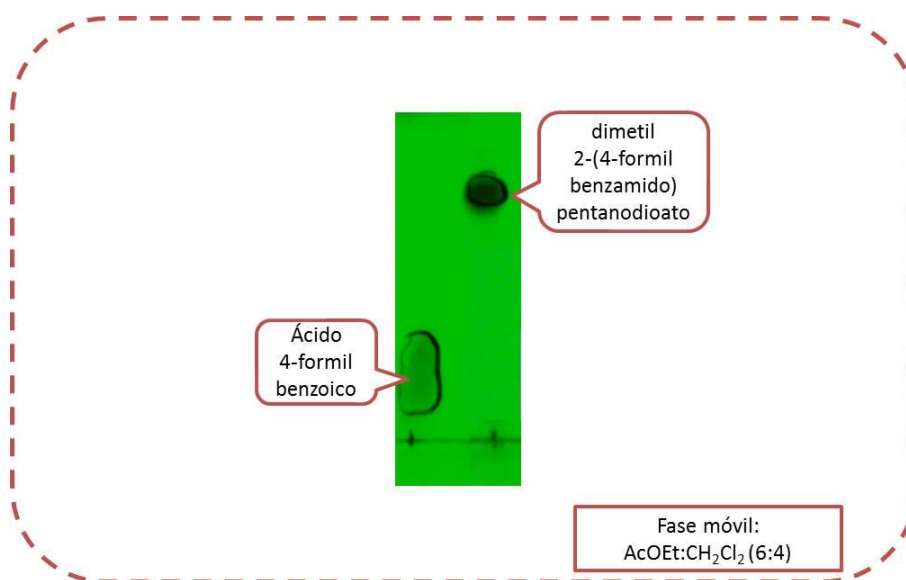


Figura 9. Cromatografía en placa de la purificación del 2-(4-formil benzamido) pentanodioato de dimetilo.

3.1.2. Síntesis de las porfirinas.

La síntesis de las porfirinas se realizó utilizando el método descrito por Lindsey (Esquema 2, página 28). Al iniciar la reacción la mezcla presentó una coloración naranja oscuro que cambió a una coloración morada oscura pasadas las dos horas del primer paso de la reacción, posterior a la adición del DDQ se observó un cambio en la coloración a un verde oscuro, la reacción fue detenida a las dos horas de agitación.

Una vez concluida la reacción se realizaron cromatografías en placa fina de gel de sílice usando como fase móvil diclorometano tanto para la NS1u (figura 10a) como para la NS2u (figura 10b), observándose los diferentes productos que genera la reacción de Lindsey, [la primer mancha corresponde a la porfirina A_4 *p*-metoxifenil ya que es la menos polar, la segunda mancha corresponde a la porfirina A_3B (NS1u) tres sustituyentes *meso* *p*-metoxifenil y un sustituyente *meso* *p*-metoxycarbonilfenil, la tercer mancha corresponde a la porfirina A_2B_2 dos sustituyentes *meso* de cada uno *p*-metoxifenil y *p*-metoxycarbonilfenil, la cuarta mancha corresponde a la porfirina AB_3 (NS2u) un sustituyente *meso* *p*-metoxifenil y tres sustituyentes *meso* *p*-metoxycarbonilfenil y la quinta mancha corresponde a la porfirina B_4 *p*-metoxycarbonilfenil ya que es la más polar]. En la figura 10a no se observa la presencia de la quinta mancha y en la figura 10b no se observa presencia de la primera mancha debido a que no se logran formar por la proporción de aldehídos usada.

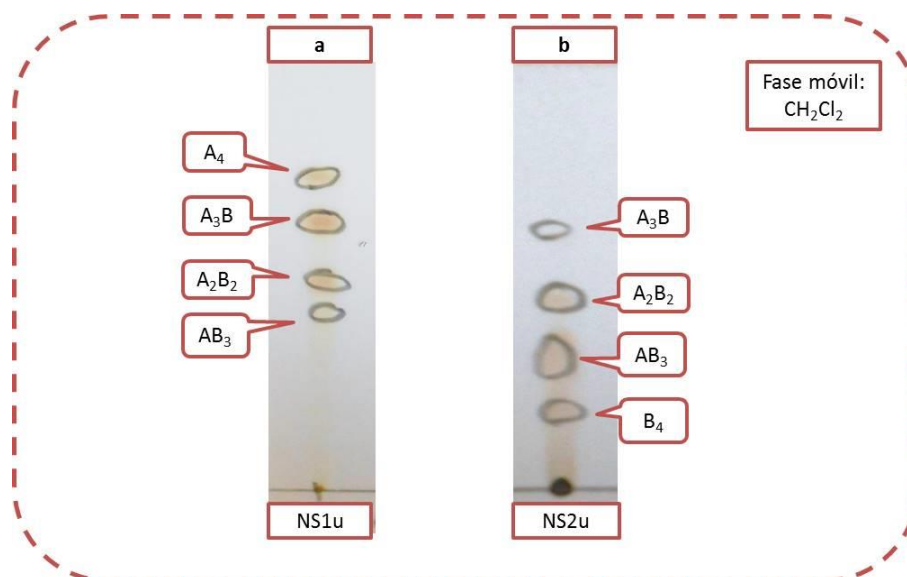


Figura 10. Cromatografía en placa de las reacciones de síntesis de las porfirinas NS1u (a) y NS2u (b).

Para la purificación de la porfirina NS1u se usó como fase móvil un sistema hexano:diclorometano 3:7, la purificación fue monitoreada por cromatografía en placa fina, las fracciones puras fueron concentradas y las fracciones con mezclas se juntaron para continuar con la purificación. Se corrieron siete cromatografías en columna para lograr purificar todo el producto de la porfirina NS1u. En la figura 11a se muestra una cromatografía en placa fina donde el primer carril corresponde a la reacción de síntesis de NS1u y el segundo carril al producto purificado de la porfirina NS1u con un R_f de 0.66 en diclorometano, el total del producto (porfirina NS1u) fue rotaevaporado y secado obteniendo 228.1 mg (23.92% de rendimiento) de un sólido color morado.

Para la purificación de la porfirina NS2u se usó como fase móvil diclorometano, la reacción fue monitoreada por cromatografía en placa fina. Se corrieron seis cromatografías en columna para lograr purificar la porfirina NS2u. En la figura 11b se muestra una cromatografía en placa fina donde el primer carril corresponde a la reacción de síntesis de la porfirina NS2u y en el segundo carril al producto purificado de la porfirina NS2u con un R_f de 0.36 en diclorometano, el total del producto (porfirina NS2u) fue rotaevaporado y secado obteniendo 201.7 mg de un sólido color morado que representa un rendimiento de 19.73%.

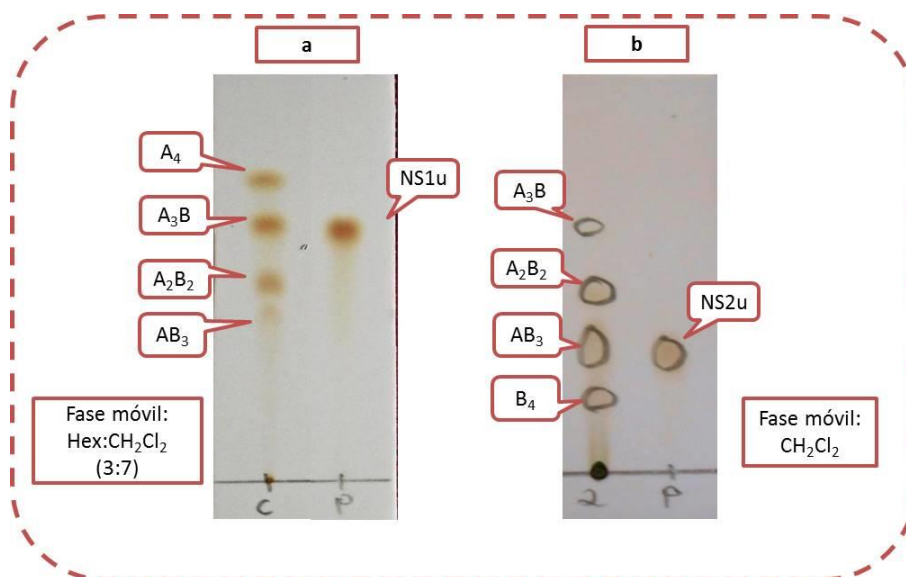


Figura 11. Cromatografía en placa de la purificación de las porfirinas NS1u (a) y NS2u (b).

La síntesis de las porfirinas NS1uf y NS2uf se realizó por el método descrito por Lindsey (esquema 2, página 28). Una vez concluida la reacción se realizaron cromatografías en placa fina de gel de sílice usando como fase móvil diclorometano :isopropanol (98:2), observándose los diferentes productos que genera la reacción de Lindsey, la primer mancha asignada a la porfirina A_4 *p*-metoxifenil ya que es la menos polar, la segunda mancha corresponde a la porfirina A_3B (NS1uf) tres sustituyentes *meso* *p*-metoxifenil y un sustituyente *meso* 4-((1,5-dimetoxi-1,5-dioxopentan-2-il)carbamoil)fenil, la tercer mancha corresponde a la porfirina A_2B_2 , la cuarta mancha corresponde a la porfirina AB_3 (NS2uf) y tres sustituyentes *meso* *p*-metoxifenil y tres sustituyentes 4-((1,5-dimetoxi-1,5-dioxopentan-2-il)carbamoil)fenil y la quinta mancha corresponde a la porfirina B_4 4-((1,5-dimetoxi-1,5-dioxopentan-2-il)carbamoil)fenil ya que es la más polar (ver figura 12).

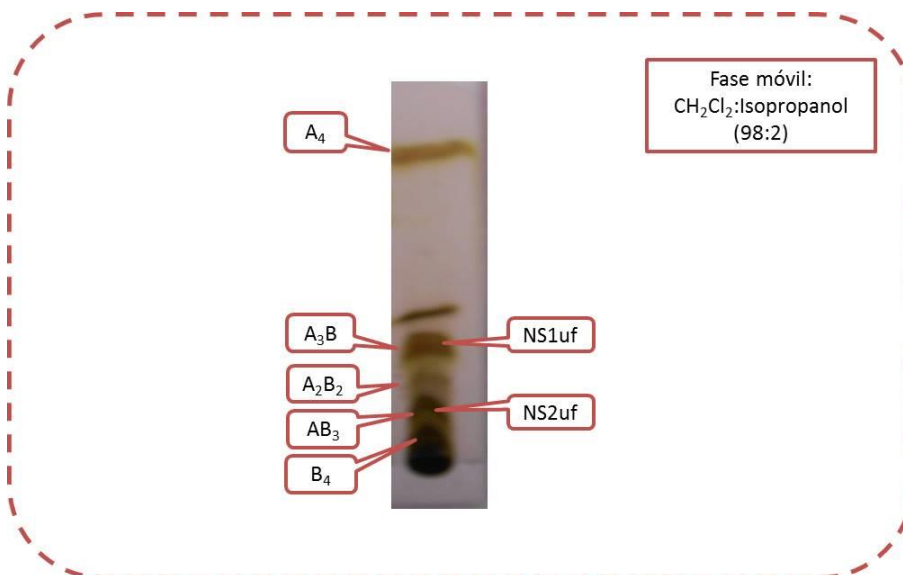


Figura 12. Cromatografía en placa de la síntesis de las porfirinas NS1uf y NS2uf.

La purificación fue monitoreada por cromatografía en placa fina. En la figura 13a se observa una cromatografía en placa fina donde se muestra en el primer carril la reacción de la porfirina NS1u con un R_f de 0.75 y en el segundo carril el producto purificado de la porfirina NS1uf con un R_f de 0.35, el total del producto (porfirina NS1uf) fue rotaevaporado y secado obteniéndose 61 mg de un sólido color morado (6% de rendimiento). En la figura 13b se muestra el cromatograma de la porfirina NS2u con un R_f de 0.64 y la porfirina NS2uf con un R_f de 0.22, el total del producto (porfirina NS2uf) fue rotaevaporado y secado obteniéndose 78 mg de un sólido color morado (5% de rendimiento).

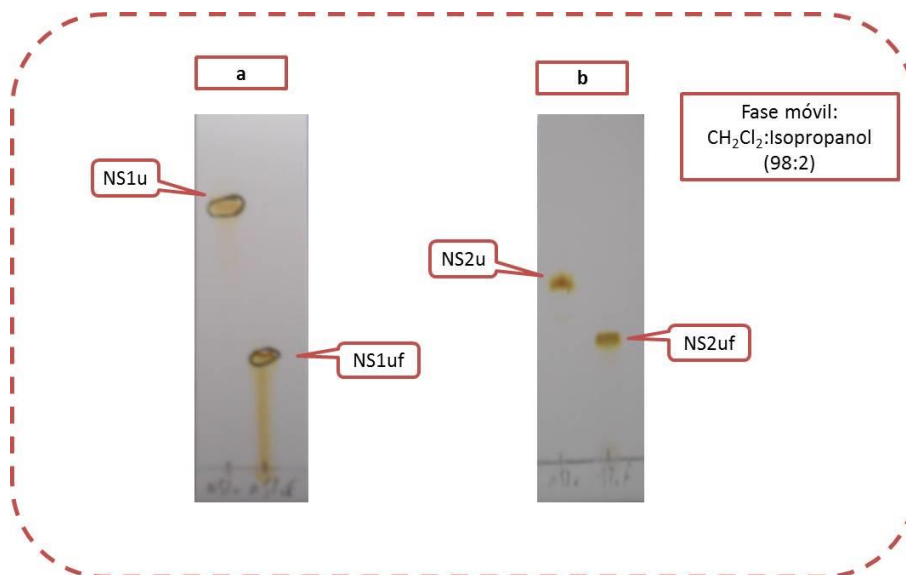


Figura 13. Cromatografía en placa de la purificación de las porfirinas NS1uf y NS2uf.

3.1.3. Metalación de las porfirinas.

Las porfirinas fueron metaladas con Cu(II) y Zn(II) como se describe en el esquema 3. Durante la reacción de metalación se observó un cambio de coloración de morado a un rojo para las metaloporfirinas de cobre mientras que para las metaloporfirinas de zinc no se observó un cambio de coloración, terminado el tiempo de reacción el crudo fue evaporado y sometido a purificación por cromatografía en columna.

En la figura 14a se muestra una cromatografía en placa fina de la metaloporfirina NS1u-Cu con R_f de 0.72 y comparada contra la porfirina de base libre NS1u (R_f 0.66). En la figura 14b se muestra una cromatografía en placa de la metaloporfirina NS2u-Cu con R_f de 0.5 y comparada contra la porfirina de base libre NS2u (R_f 0.36).

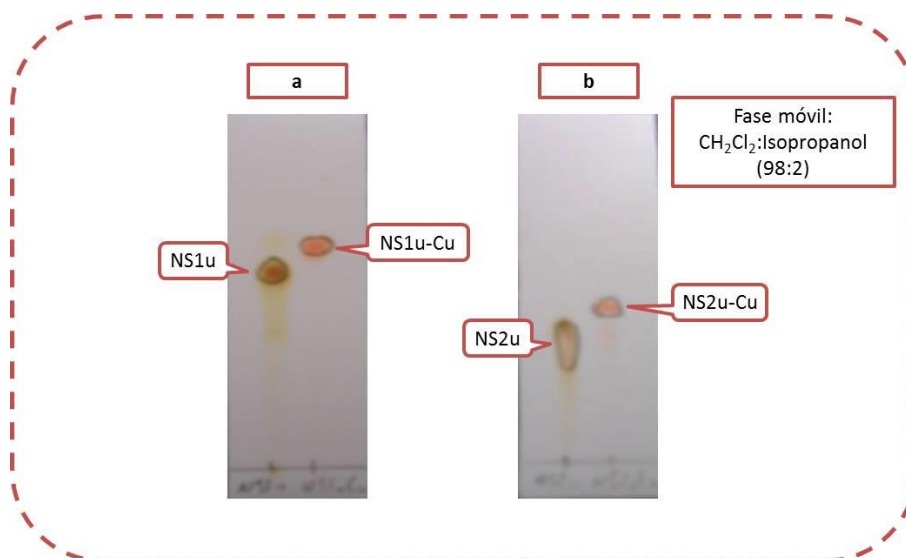


Figura 14. Cromatografía en placa de la purificación de las metaloporfirinas NS1u-Cu (a) y NS2u-Cu (b).

El rendimiento de la reacción de metalación de la porfirina NS1u-Cu fue de 55% (17.9 mg) y el rendimiento de la reacción de metalación de la porfirina NS2u-Cu fue de 85.4% (28.2 mg).

En la figura 15a se muestra una cromatografía en placa fina de la metaloporfirina NS1uf-Cu con R_f de 0.46 y comparada contra la porfirina de base libre NS1uf (R_f 0.35). Se obtuvieron 21.1 mg de un sólido color rojo (NS1uf-Cu) lo que representa un rendimiento del 66%. En la figura 15b se muestra una cromatografía en placa fina de la metaloporfirina NS2uf-Cu con R_f de 0.26 y comparada contra la porfirina de base libre NS2uf (R_f 0.22). Se obtuvieron 18.1 mg (56% de rendimiento) de un sólido color rojo.

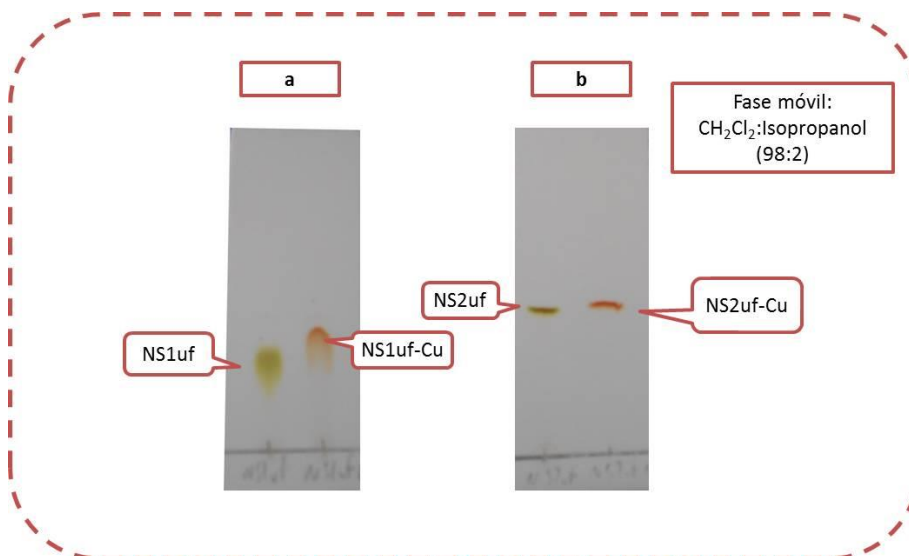


Figura 15. Cromatografía en placa de la purificación de las metaloporfirinas NS1uf-Cu (a) y NS2uf-Cu (b).

En la figura 16 se muestran cromatografías en placa fina de la metaloporfirinas obtenidas, NS1u-Zn (figura 16a) con R_f de 0.60 y NS2u-Zn (figura 16b) con R_f de 0.33. La metaloporfirina NS1u-Zn fue obtenida con un rendimiento del 71% (22.7 mg) y la metaloporfirina NS2u-Zn fue obtenida con un rendimiento del 82% (22.6 mg).

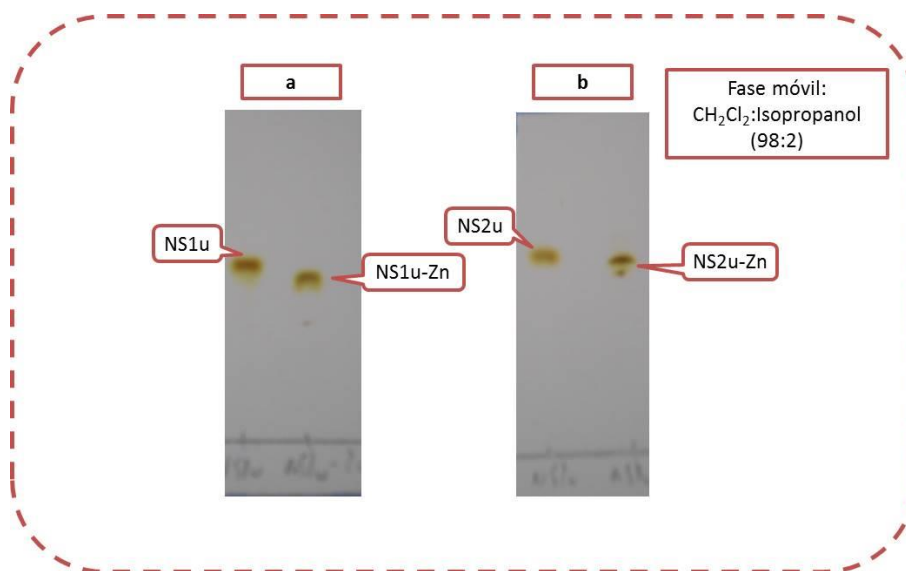


Figura 16. Cromatografía en placa de la purificación de las metaloporfirinas NS1u-Zn (a) y NS2u-Zn (b).

En la figura 17a se muestra una cromatografía en placa fina de la metaloporfirina NS1uf-Zn con un Rf de 0.36 comparada contra la porfirina de base libre NS1uf (Rf 0.35). Se obtuvieron 21.4 mg (67% de rendimiento) de un sólido color morado (NS1uf-Zn). En la figura 17b se muestra una cromatografía en placa de la metaloporfirina NS2uf-Zn con Rf de 0.26 comparada contra la porfirina de base libre NS2uf (Rf 0.22). Finalmente las fracciones que contenían la metaloporfirina NS2uf-Zn fueron concentradas y rotaevaporadas obteniendo 14.1 mg (44% de rendimiento) de un sólido color morado.

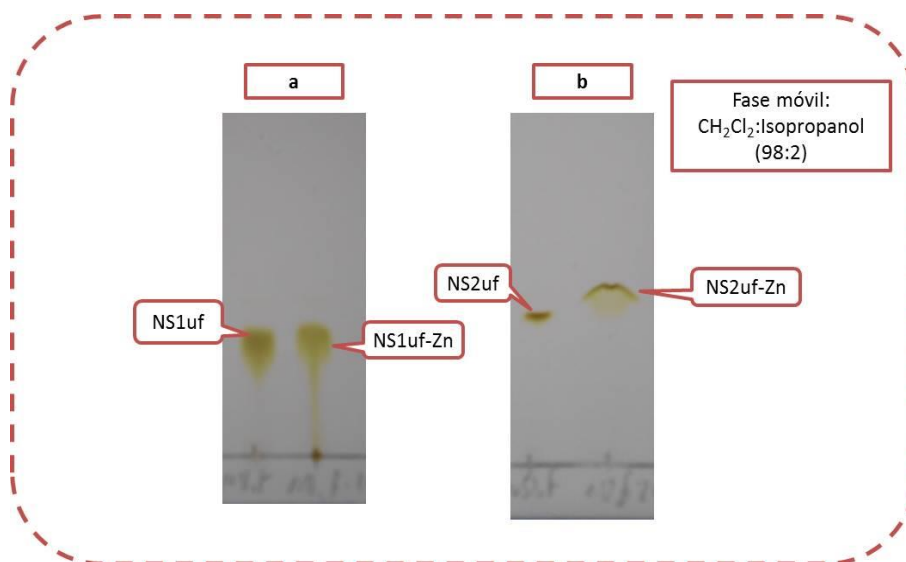


Figura 17. Cromatografía en placa de la purificación de las metaloporfirinas NS1uf-Zn (a) y NS2uf-Zn (b).

3.2. CARACTERIZACIÓN.

3.2.1. Ácido 4-formil benzoico.

3.2.1.1. Resonancia magnética nuclear ¹H.

El espectro de RMN ¹H (figura 18) muestra una señal con δ de 7.99 ppm (*a*), un doblete ($J = 8$ Hz) que integra para los dos protones *orto* al ácido carboxílico, a δ 8.26 ppm (*b*) se tiene un doblete ($J = 8$ Hz) que integra para los dos protones *orto* al aldehído y en δ 10.13 ppm (*c*) se observa un singlete que integra para un protón del aldehído. En la figura 19 se marcan los protones descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

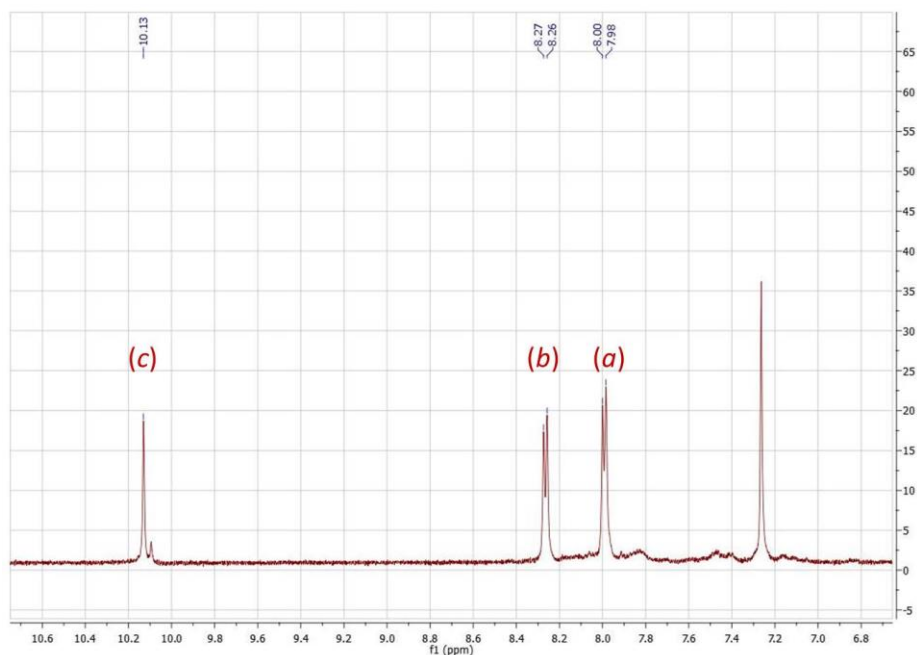


Figura 18. Espectro de RMN ^1H del ácido 4-formil benzoico.

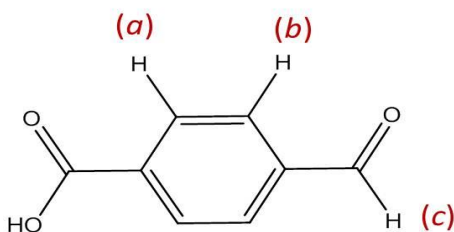


Figura 19. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H del ácido 4-formil benzoico.

3.2.1.2. Resonancia magnética nuclear ^{13}C .

El espectro de RMN ^{13}C (figura 20) muestra una señal con δ de 129 ppm (*a*) que corresponde a los carbonos C3 y C5 aromáticos, una señal a δ 130 ppm (*b*) que corresponde a los carbonos C2 y C6 aromáticos y en δ 191 ppm (*c*) que corresponde al C=O del aldehído. En la figura 21 se marcan los carbonos descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

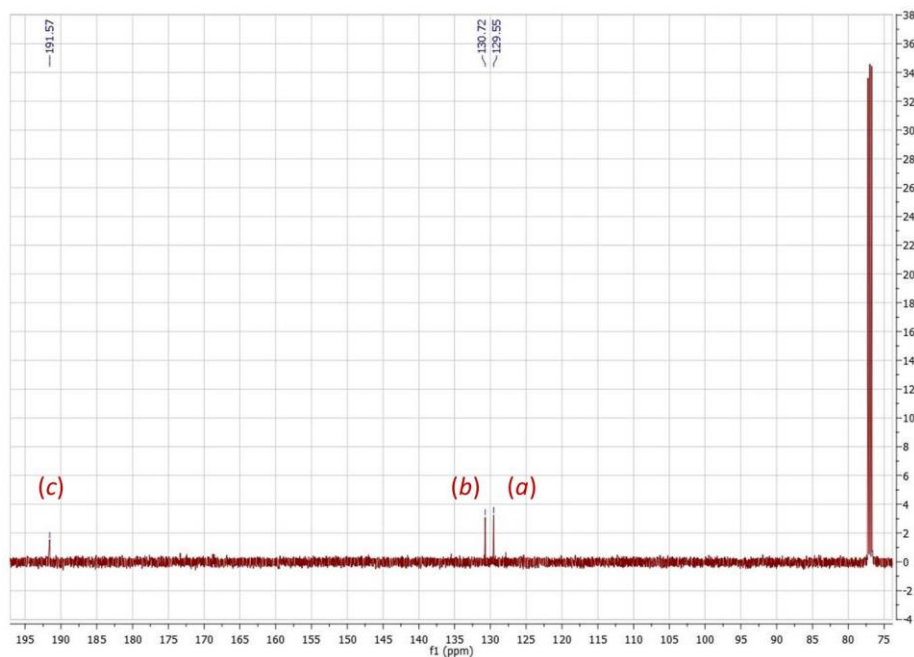


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C del ácido 4-formil benzoico.

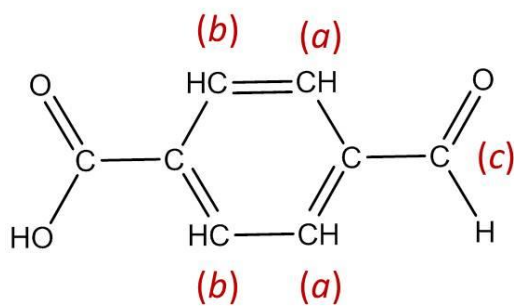


Figura 21. Asignación de las señales del espectro de RMN ^{13}C del ácido 4-formil benzoico.

3.2.2. 2-aminopentanodioato de dimetilo.

3.2.2.1. Resonancia magnética nuclear ^1H .

El espectro de RMN ^1H (figura 22) muestra una señal con δ de 2.32 ppm (a) un multiplete que integra para dos protones, a δ 2.43 ppm (b) se tiene un triplete empalmado a un multiplete que integra para dos protones, en δ 3.70 ppm (c) se observa un singlete que integra para seis protones de los metilos de los ésteres, en δ 4.21 ppm (d) se observa un singlete que integra para dos protones unidos al nitrógeno y a δ 4.23 ppm (e) se observa un triplete que integra para un protón. En la figura 23 se marcan los protones descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

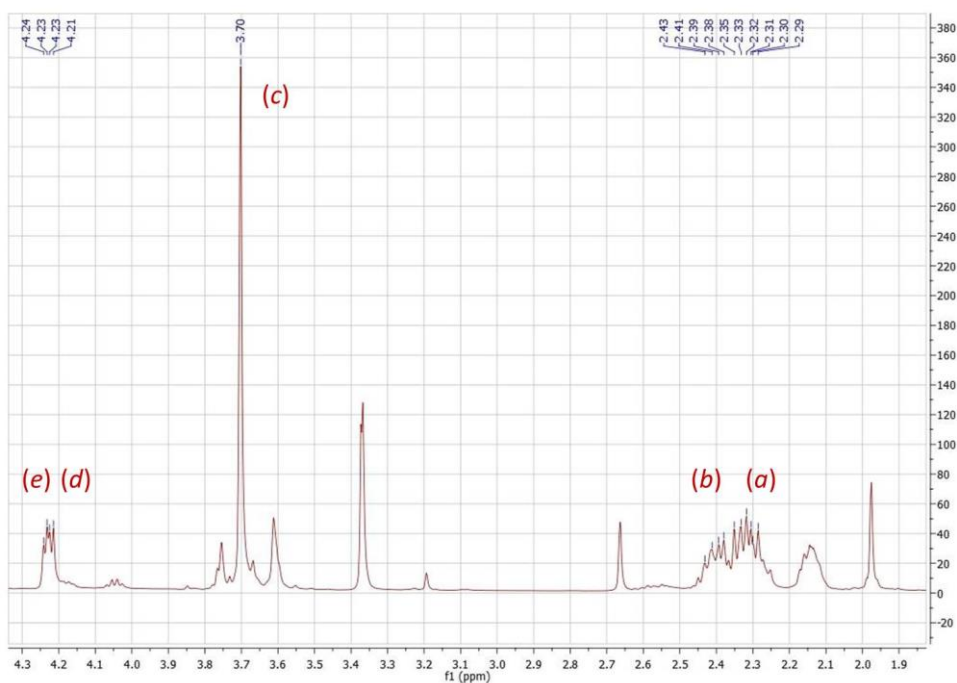


Figura 22. Espectro de RMN ^1H del 2-aminopentanodioato de dimetilo.

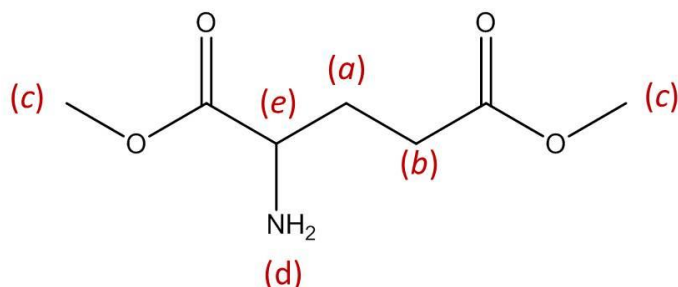


Figura 23. Asignación de las señales del espectro de RMN ¹H del 2-aminopentanodioato de dimetilo.

3.2.2.2. Resonancia magnética nuclear ¹³C.

El espectro de RMN ¹³C (figura 24) muestra una señal con δ de 24 ppm (*a*) que corresponde al CH₂, una señal a δ 29 ppm (*b*) que corresponde al CH₂ unido al carbonilo y en δ 52 ppm (*c*) que corresponde al CH de la molécula, una señal a δ 55 ppm (*d*) que corresponde a los CH₃, una señal a δ 172 ppm (*e*) que corresponde al carbonilo unido al CH₂ y en δ 178 ppm (*f*) que corresponde al carbonilo unido al carbono CH-NH₂. En la figura 25 se marcan los carbonos descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

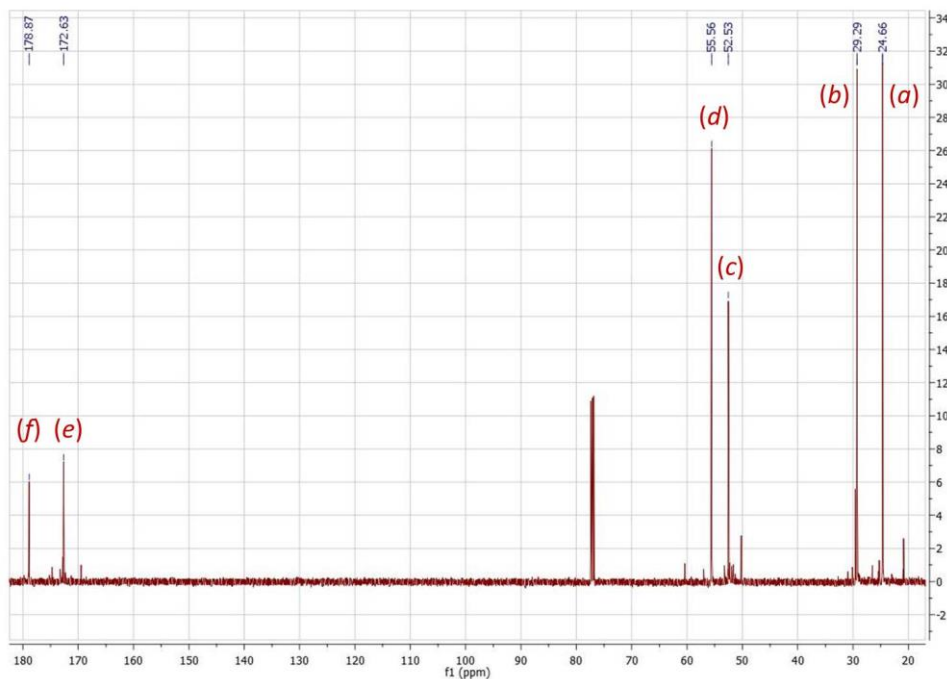


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C del 2-aminopentanodioato de dimetilo.

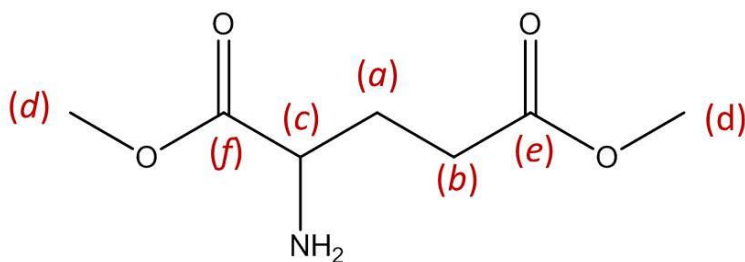


Figura 25. Asignación de las señales del espectro de RMN ^{13}C del 2-aminopentanodioato de dimetilo.

3.2.3. 2-(4-formil benzamido) pentanodioato de dimetilo.

3.2.3.1. Resonancia magnética nuclear ^1H .

El espectro de RMN ^1H (figura 26) muestra una señal con δ de 2.18 ppm (*a*), un triplete que integra para dos protones, a δ 2.39 ppm (*b*) se tiene un multiplete que integra para dos protones, en δ 3.69 ppm (*c*) se observa un singulete que integra para tres protones del metilo del éster, en δ 3.76 ppm (*d*) se observa un singulete que integra para tres protones del metilo del éster cerca del nitrógeno, en δ 4.64 ppm (*e*) un triplete del protón del carbono unido al nitrógeno, en δ 6.24 ppm (*f*) un singulete que integra para dos protones que están unidos al nitrógeno, en δ 7.99 ppm (*g*) un doblete ($J=8$ Hz) que integra para dos protones *orto* al aldehído, en δ 8.26 ppm (*h*) un doblete ($J=8$ Hz) que integra para dos protones *meta* al aldehído y a δ 10.13 ppm (*i*) se observa un singulete que integra para un protón del aldehído. En la figura 27 se marcan los protones descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

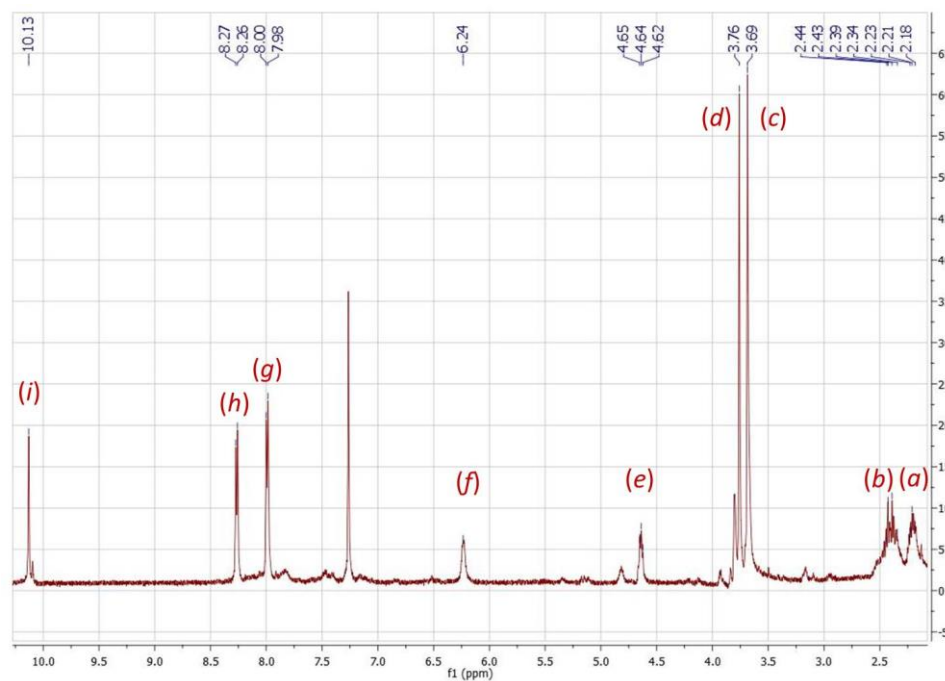


Figura 26. Espectro de RMN ^1H del 2-(4-formil benzamido) pentanodioato de dimetilo.

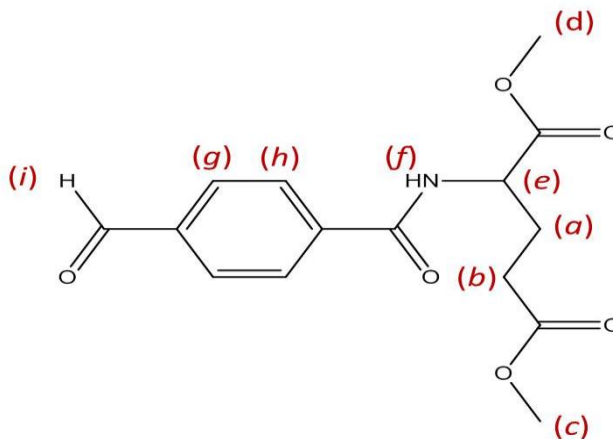


Figura 27. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H del 2-(4-formil benzamido) pentanodioato de dimetilo.

3.2.3.2. Resonancia magnética nuclear ^{13}C .

El espectro de RMN ^{13}C (figura 28) muestra una señal con δ de 27 ppm (*a*) que corresponde al CH_2 unido al carbonilo del éster, una señal a δ 30 ppm (*b*) que corresponde al CH_2 unido al carbonilo cerca de la amida, en δ 51 ppm (*c*) que corresponde a los CH_3 de la molécula, una señal a δ 52 ppm (*d*) que corresponde al CH, una señal a δ 129 ppm (*e*) que corresponde a los carbonos dos y seis aromáticos, una señal a δ 130 ppm (*f*) que corresponde a los carbonos tres y cinco aromáticos y en δ 191 ppm (*g*) que corresponde al carbono del aldehído. En la figura 29 se marcan los carbonos descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

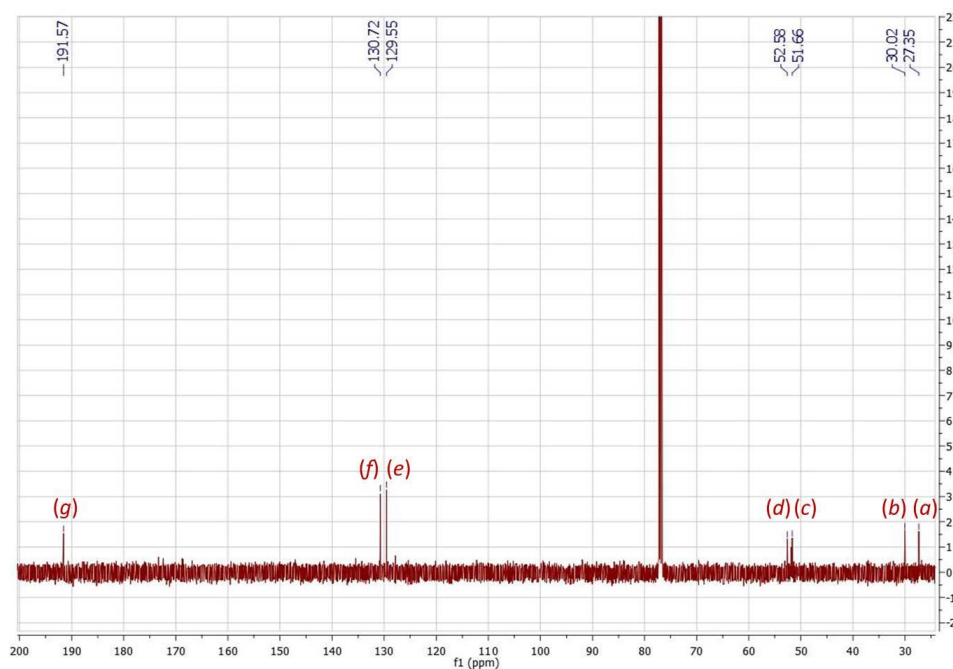


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C del 2-(4-formil benzamido) pentanodioato de dimetilo.

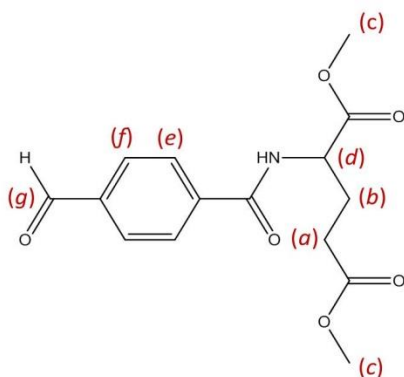


Figura 29. Asignación de las señales del espectro de RMN ^{13}C del 2-(4-formil benzamido) pentanodioato de dimetilo.

3.2.4. Porfirinas

3.2.4.1. Porfirina NS1u RMN de ^1H .

El espectro de RMN ^1H (figura 30) muestra una señal con δ de -2.7 ppm (a), un singlete que integra para los dos protones unidos al N del núcleo porfirínico, a δ 4.08 ppm (b) se tiene un singlete que integra para nueve protones, los protones del metoxilo y en δ 4.11 ppm (c) se observa un singlete que integra para tres protones del metilo del éster.

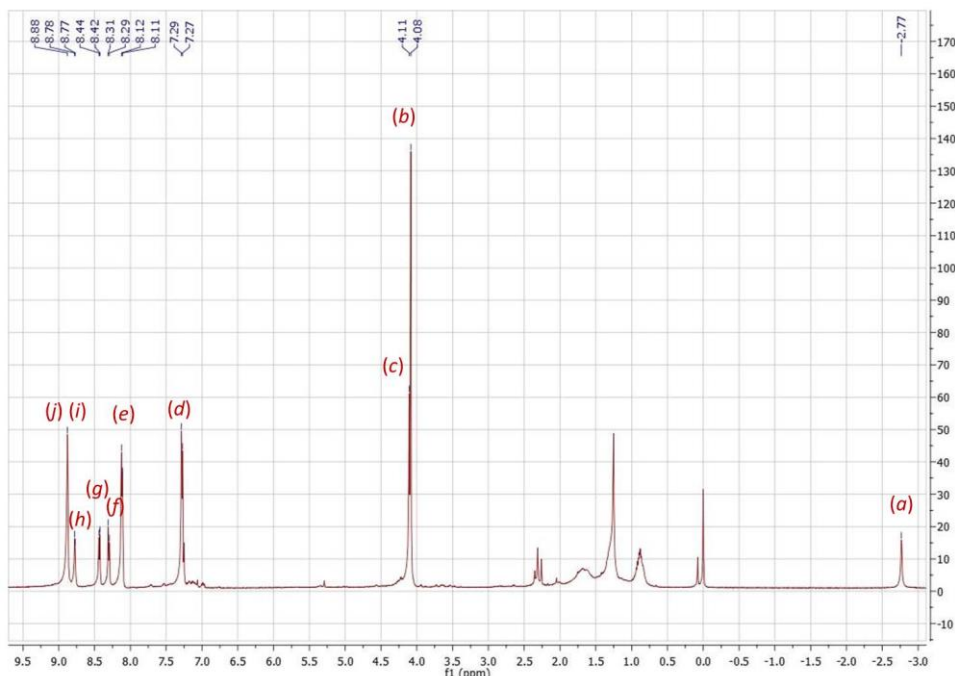


Figura 30. Espectro de RMN ^1H de la porfirina NS1u.

En la ampliación del espectro mostrada en la figura 31, se observa un desplazamiento químico de 7.28 ppm (*d*) se observa un doblete ($J = 7.5$ Hz) que integra para seis protones, los protones en posición *meta* del *p*-metoxifenilo. En δ 8.12 ppm (*e*) se observa un doblete ($J = 7.5$ Hz) que integra para seis protones, los protones *orto* del *p*-metoxifenilo. A un desplazamiento químico de 8.30 ppm (*f*) se muestra un doblete ($J = 7.5$ Hz) que integra para dos protones, los protones *orto* del *p*-metoxycarbonilfenilo. En δ 8.43 ppm (*g*), se observa un doblete ($J=7.5$ Hz) que integra para los dos protones, *meta* del *p*-metoxycarbonilfenilo.

Finalmente se observan las señales correspondientes a los protones del pirrol, en δ 8.78 ppm (*h*) se observa un doblete ($J = 4$ Hz), este doblete integra para los dos protones del pirrol cercanos al *p*-metoxifenilo, en δ 8.88 ppm (*i*) se observa un singlete que integra para cuatro protones del pirrol entre dos *p*-metoxifenilos y a δ 8.89 ppm (*j*) se encuentra un doblete ($J=4$ Hz) empalmado con el singlete, esta señal integra para dos protones que pertenecen a los protones del pirrol cercanos al *p*-metoxycarbonilfenilo. En la Figura 32 se marcan los protones descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

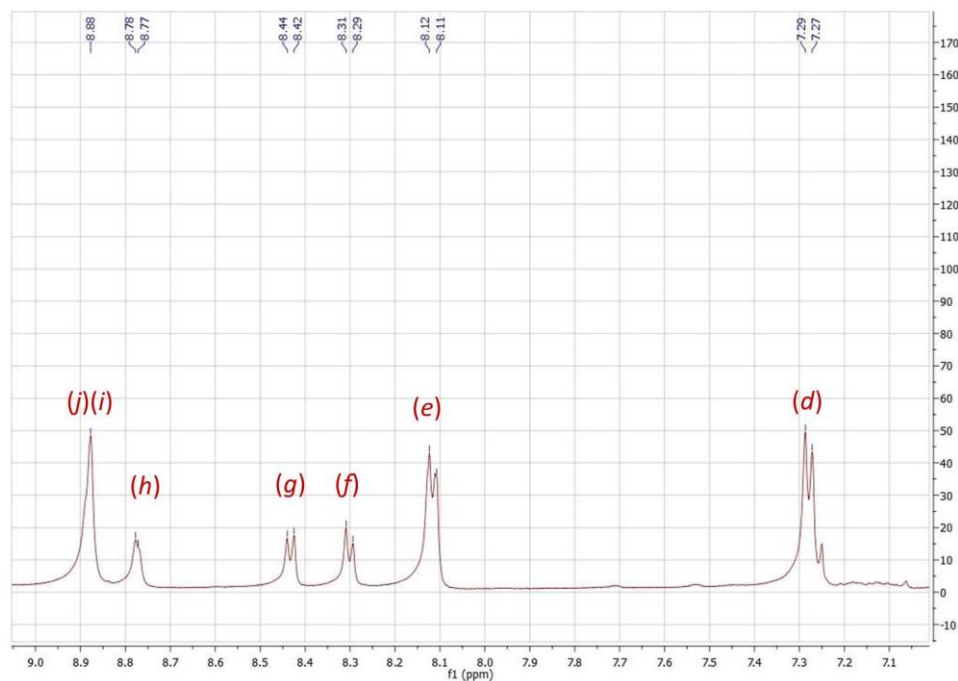


Figura 31. Ampliación del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS1u.

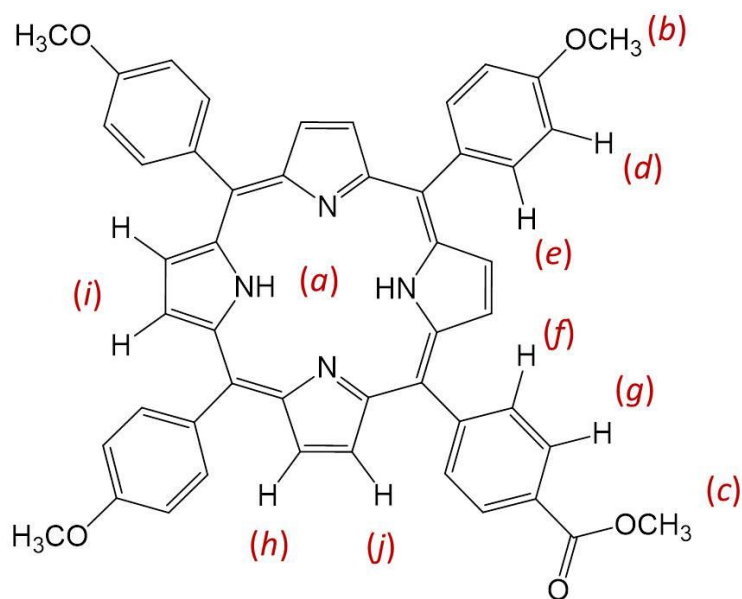


Figura 32. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS1u.

3.2.4.2. Porphirina NS2u RMN de ^1H .

El espectro de RMN ^1H (figura 33) muestra una señal con δ de -2.8 ppm (a), un singulete que integra para los dos protones unidos al N del núcleo porfirínico, a δ 4.07 ppm (b) se tiene un singulete que integra para tres protones, los protones del metilo del éster y en δ 4.10 ppm (c) se observa un singulete que integra para nueve protones del metoxilo.

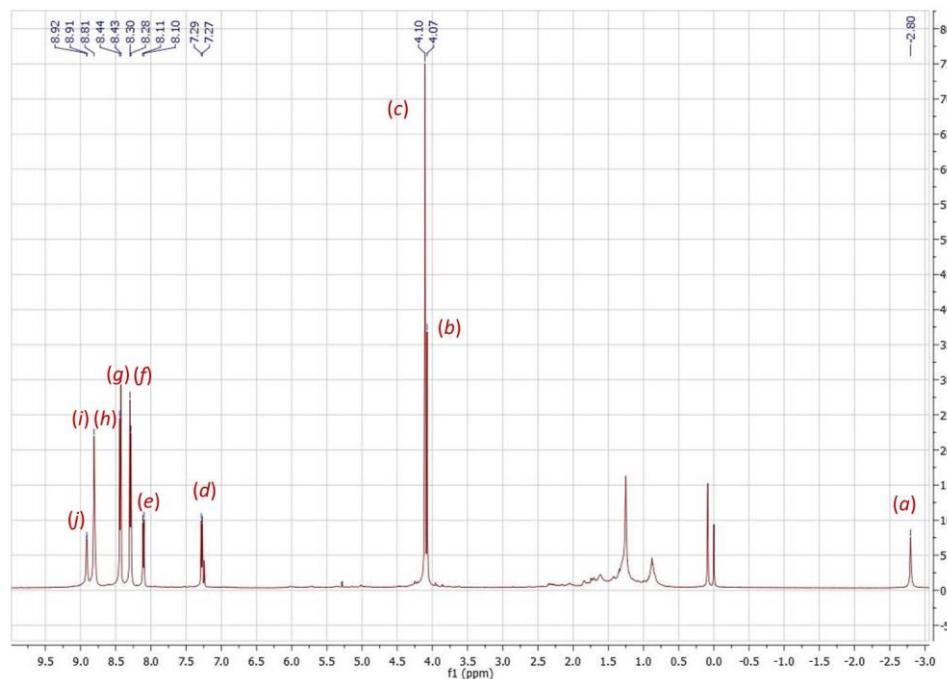


Figura 33. Espectro de RMN ^1H de la porfirina NS2u.

En la ampliación del espectro mostrada en la figura 34, se observan con mayor claridad las señales de los protones restantes, a un desplazamiento químico de 7.28 ppm (*d*) se observa un doblete ($J = 8 \text{ Hz}$) que integra para dos protones, los protones en posición *meta* del *p*-metoxifenilo. En δ 8.11 ppm (*e*) se observa un doblete ($J = 8 \text{ Hz}$) que integra para dos protones, los protones *orto* del *p*-metoxifenilo. A un desplazamiento químico de 8.29 ppm (*f*) se muestra un doblete ($J = 8 \text{ Hz}$) que integra para 6 protones *orto* del *p*-metoxycarbonilfenilo. En δ 8.42 ppm (*g*), se observa un doblete ($J=8 \text{ Hz}$) que integra para los 6 protones *meta* del *p*-metoxycarbonilfenilo.

Finalmente se observan las señales correspondientes a los protones del pirrol, en δ 8.79 ppm (*h*) se observa un doblete ($J = 4.5$ Hz) empalmado con el singlete, este doblete integra para los dos protones del pirrol cercanos al *p*-metoxifenilo, en δ 8.81 ppm (*i*) se observa un singlete que integra para cuatro protones del pirrol entre dos *p*-metoxycarbonilfenilo y a δ 8.91 ppm (*j*) se encuentra un doblete ($J=4.5$ Hz) que integra para dos protones que pertenecen a los protones del pirrol cercanos al *p*-metoxycarbonilfenilo. En la figura 35 se marcan los protones descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

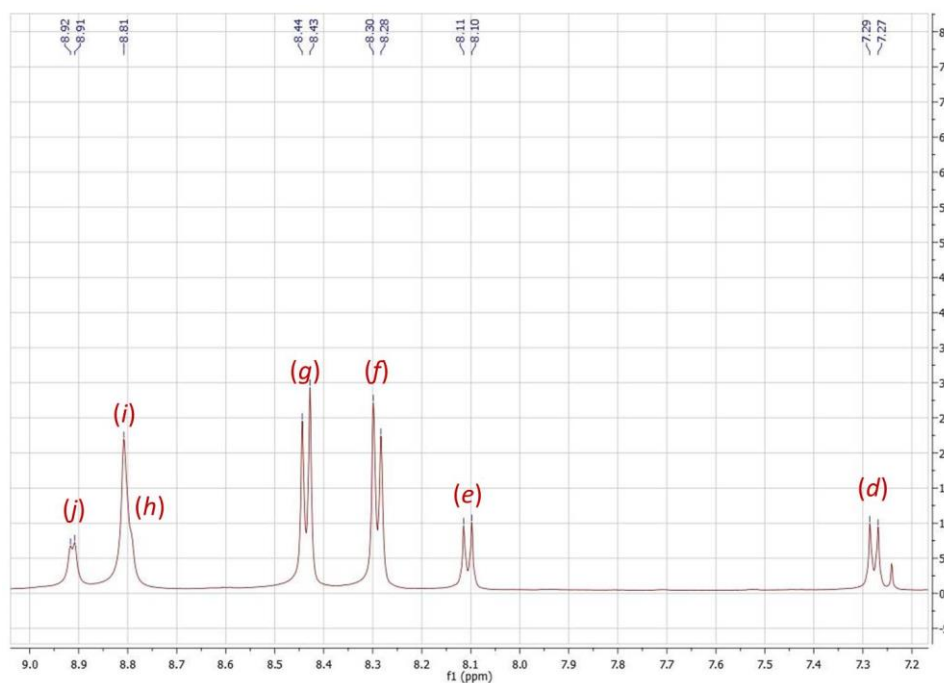


Figura 34. Ampliación del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS2u.

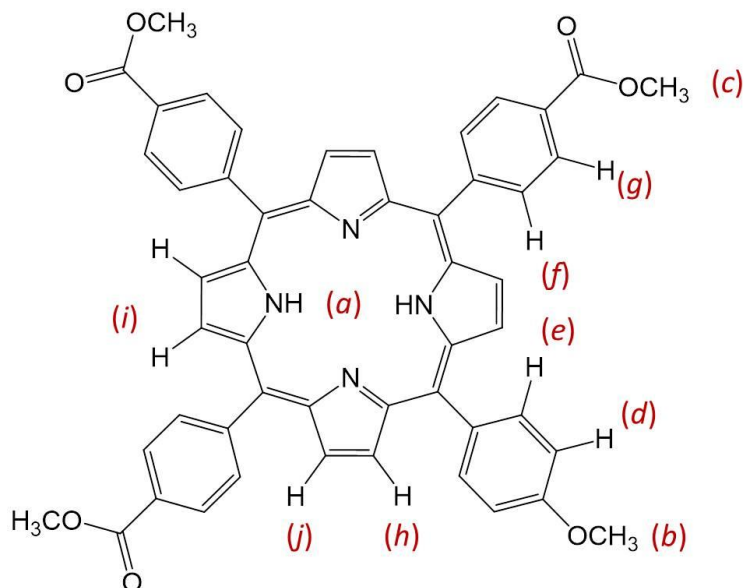


Figura 35. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS2u.

3.2.4.3. Porphirina NS1uf RMN de ^1H .

El espectro de RMN ^1H (figura 36) muestra una señal con δ de -2.76 ppm (a), un singulete que integra para los dos protones unidos al N del núcleo porfirínico, a un δ 1.21 ppm (b) se tiene un cuarteto que integra para dos protones, los protones del carbono beta del glutamato, a un δ 1.25 ppm (c) se tiene un triplete que integra para dos protones pertenecientes al carbono gamma del glutamato y a un δ 4.11 ppm (d) se tiene un singulete que integra para nueve protones, los protones del metoxilo y en δ 4.12 ppm (e) se observa un singulete que integra para seis protones del metilo de los ésteres.

A un desplazamiento químico de 7.27 ppm (*f*) se observa un doblete ($J = 7.5$ Hz) que integra para 6 H, los protones en posición *meta* del *p*-metoxifenilo. En δ 8.14 ppm (*g*) se observa un doblete ($J = 7.5$ Hz) que integra para seis protones, los protones *orto* del *p*-metoxifenilo. A un desplazamiento químico de 8.35 ppm (*h*) se muestra un doblete ($J = 7.5$ Hz) que integra para dos protones, los protones *orto* del fenilo funcionalizado. En δ 8.45 ppm (*i*), se observa un doblete ($J=7.5$ Hz) que integra para los dos protones, *meta* del fenilo funcionalizado.

Finalmente se observan las señales correspondientes a los protones del pirrol, en δ 8.81 ppm (*j*) se observa un doblete ($J = 4$ Hz), este doblete integra para los dos protones del pirrol cercanos al *p*-metoxifenilo, en δ 8.90 ppm (*k*) se observa un singulete que integra para cuatro protones del pirrol entre dos *p*-metoxifenilos y a δ 8.92 ppm (*l*) se encuentra un doblete ($J=4$ Hz) empalmado con el singulete, esta señal integra para dos protones que pertenecen a los protones del pirrol cercanos al fenilo funcionalizado.

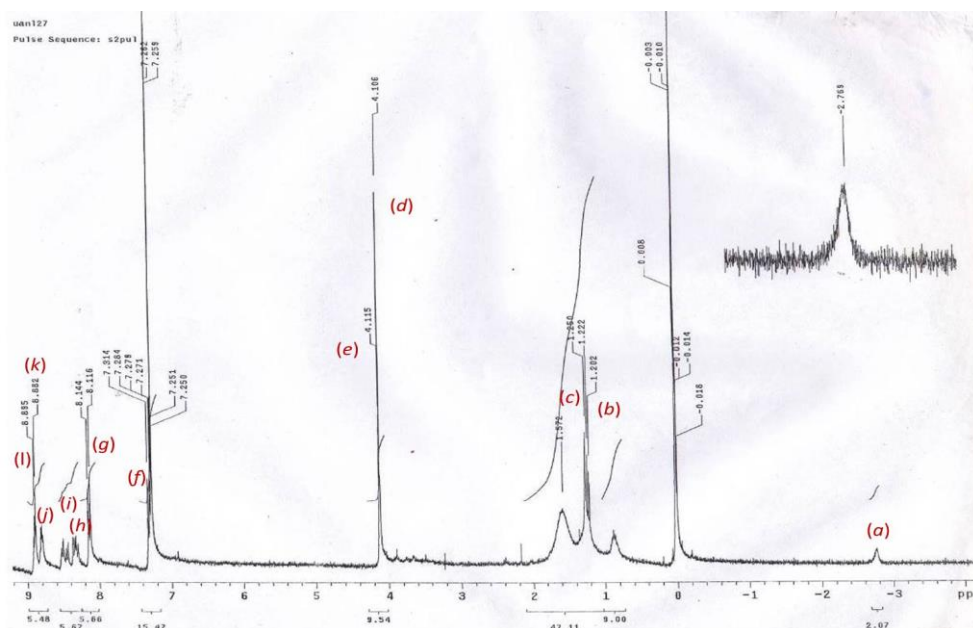


Figura 36. Espectro de RMN ^1H de la porfirina NS1uf.

En la Figura 37 se marcan los protones descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

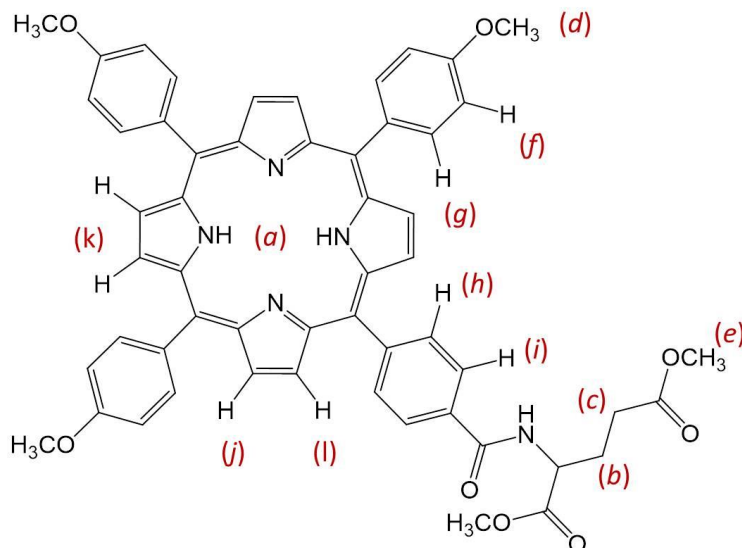


Figura 37. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS1uf.

3.2.4.4. Porphirina NS2uf RMN de ^1H .

El espectro de RMN ^1H (figura 38) muestra una señal con δ de -2.77 ppm (a), un singlete que integra para los dos protones unidos al N del núcleo porfirínico, a un δ 1.25 ppm (b) se tiene un tetraplete que integra para 6 protones, los protones del carbono beta del glutamato, a un δ 1.28 ppm (c) se tiene un triplete que integra para dos protones pertenecientes al carbono gamma del glutamato y a un δ 3.87 ppm (d) se presenta un singlete que integra para tres protones pertenecientes al metoxilo y a un δ 4.10 ppm (e) se tiene un singlete que integra para nueve protones, los protones del metilo del éster unido al carbono alfa del glutamato y en un δ 4.12 ppm (f) se observa un singlete que integra para nueve protones del metilo del éster del carbono delta del glutamato.

A un desplazamiento químico de 7.2 ppm (*g*) se observa un doblete ($J = 8$ Hz) que integra para dos H, los protones en posición *meta* del *p*-metoxifenilo. En δ 8.15 ppm (*h*) se observa un doblete ($J = 8$ Hz) que integra para dos protones, los protones *orto* del *p*-metoxifenilo. A un desplazamiento químico de 8.32 ppm (*i*) se muestra un doblete ($J = 8$ Hz) que integra para seis protones *orto* del fenilo funcionalizado. En δ 8.42 ppm (*j*), se observa un doblete ($J=8$ Hz) que integra para los seis protones *meta* del fenilo funcionalizado.

Finalmente se observan las señales correspondientes a los protones del pirrol, en δ 8.81 ppm (*k*) se observa un doblete ($J = 4.5$ Hz) empalmado con el singulete, este doblete integra para los dos protones del pirrol cercanos al *p*-metoxifenilo, en δ 8.82 ppm (*l*) se observa un singulete que integra para cuatro protones del pirrol entre dos fenilos funcionalizados y a un δ 8.91 ppm (*m*) se encuentra un doblete ($J=4.5$ Hz) que integra para dos protones que pertenecen los protones del pirrol cercanos al fenilo funcionalizado.

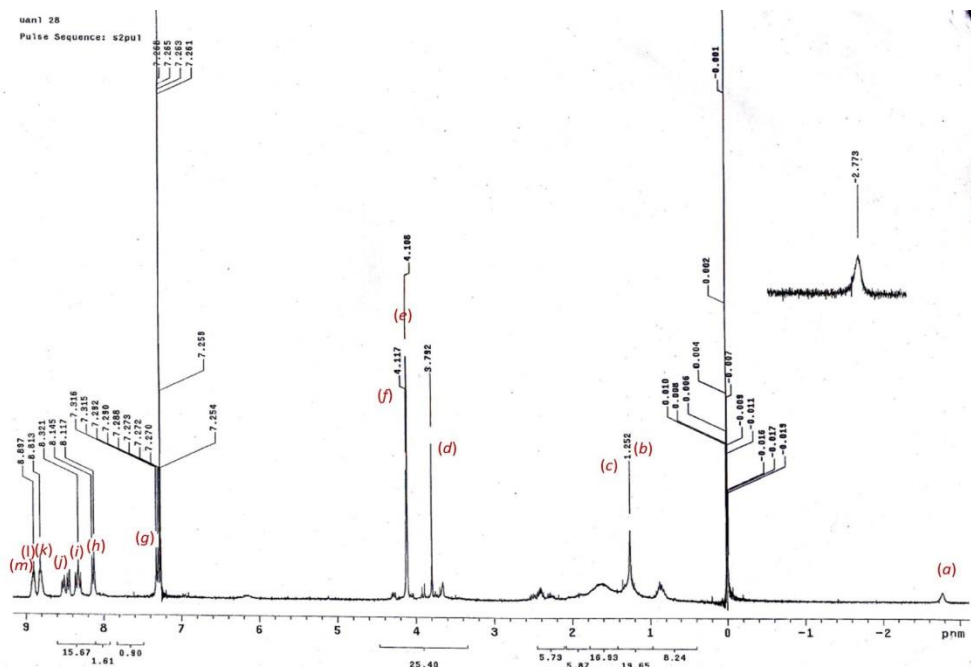


Figura 38. Espectro de RMN ^1H de la porfirina NS2uf.

En la figura 39 se marcan los protones descritos anteriormente en letras minúsculas y entre paréntesis, para aclarar la asignación dada a cada señal.

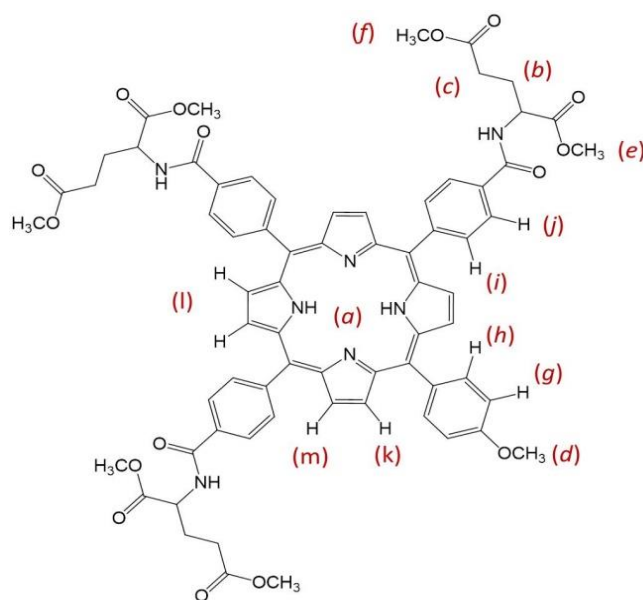


Figura 39. Asignación de las señales del espectro de RMN ^1H de la porfirina NS2uf.

3.2.4.5. Espectroscopia UV-Vis de las porfirinas.

Se realizaron las lecturas de los espectros de absorción UV-Vis de las porfirinas NS1u, NS2u, NS1uf y NS2uf. Se utilizó diclorometano como disolvente. Los espectros de las porfirinas mostraron un patrón característico de esta clase de moléculas, una banda intensa llamada banda Soret alrededor de 420 nm y cuatro bandas de menor intensidad llamadas bandas Q. En la tabla 2 se muestran los picos máximos de absorción de las porfirinas tanto de la banda Soret y bandas Q. En la figura 40 se muestran los espectros de absorción UV-Vis de las porfirinas, se inserta una ampliación de las bandas Q.

Tabla 2. Picos máximos de absorción de las porfirinas.

Porfirina	λ_{\max} (Soret)	λ_{\max} (bandas Q) (nm)			
	(nm)	Qy(1,0)	Qy(0,0)	Qx(1,0)	Qx(0,0)
NS1u	423	517	544	593	649
NS2u	425	516	552	591	647
NS1uf	421	518	555	593	649
NS2uf	424	517	557	592	648

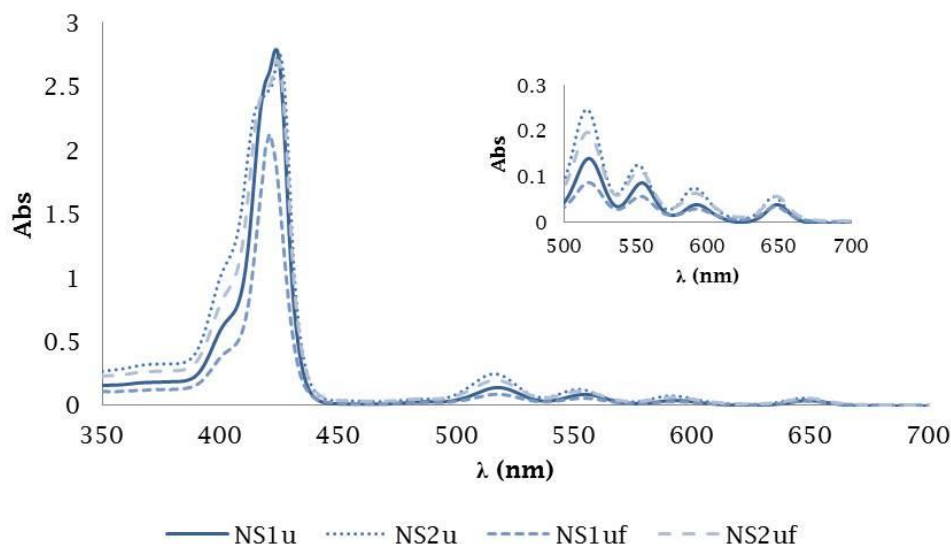


Figura 40. Espectros de absorción UV-Vis de las porfirinas.

3.2.5. Metaloporfirinas.

3.2.5.1. Espectroscopia UV-Vis de las metaloporfirinas.

Se realizaron los espectros de absorción UV-Vis de las metaloporfirinas NS1u, NS2u, NS1uf y NS2uf de cobre y zinc. Se observó el patrón característico de las metaloporfirinas, una banda intensa Soret alrededor de 420 nm y dos bandas Q. En la tabla 3 se muestran los picos máximos de absorción. En las figuras 41 y 42 se muestran los espectros de absorción UV-Vis de las metaloporfirinas de cobre y zinc, respectivamente en ambas figuras se inserta una ampliación de las bandas Q.

Tabla 3. Picos máximos de absorción de las metaloporfirinas.

Porfirina	λ_{max} (Soret) (nm)	λ_{max} (bandas Q) (nm)	
		Q(1,0)	Q(0,0)
NS1u-Cu	418	540	578
NS2u-Cu	417	539	577
NS1uf-Cu	415	546	572
NS2uf-Cu	419	540	575
NS1u-Zn	422	550	592
NS2u-Zn	420	551	592
NS1uf-Zn	424	555	598
NS2uf-Zn	422	550	591

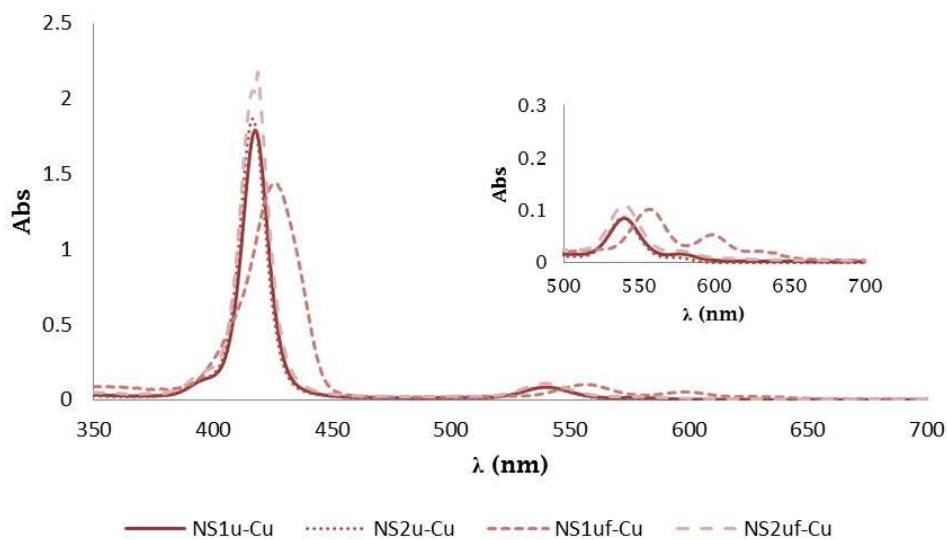


Figura 41 Espectros de absorción UV-Vis de las metaloporfirinas de cobre.

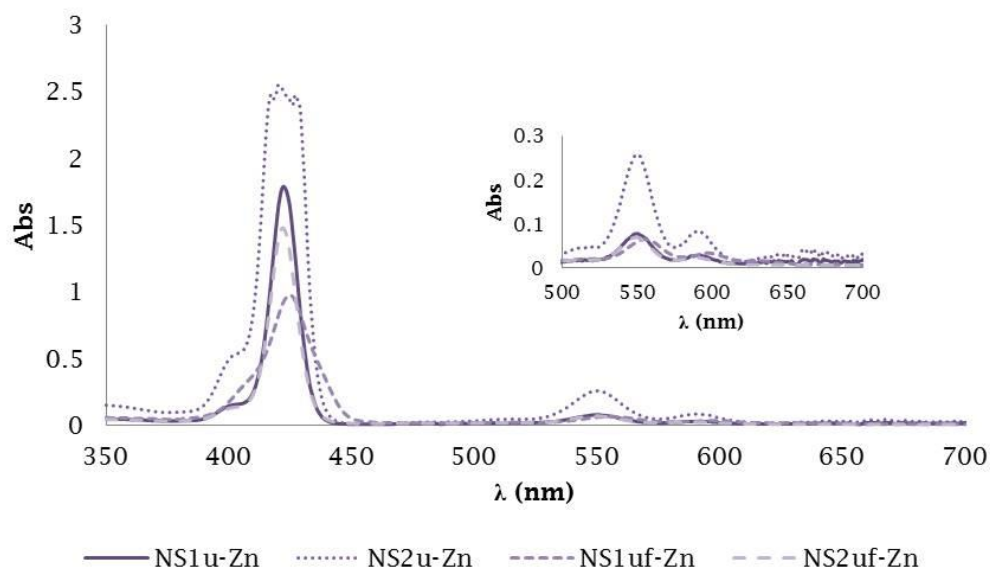


Figura 42. Espectros de absorción UV-Vis de las metaloporfirinas de zinc.

3.3. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FOTODINÁMICAS.

3.3.1. Rendimiento cuántico de oxígeno singlete.

Se determinaron los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete ($\Phi\Delta$) con el método de iluminación en el estado estacionario. Se realizó el seguimiento de la reacción espectrofotométricamente graficando la absorbancia del 1-3-difenilisobenzofurano (aceptor de oxígeno singlete) a 410 nm en función del tiempo. En la figura 43 se observan las curvas de la absorbancia del actinómetro en función del tiempo para todas las porfirinas así como la porfirina de referencia (*p*-THPP). En la tabla 4 se muestran los valores de $\Phi\Delta$ obtenidos, así como las constantes de velocidades experimentales de las porfirinas. A mayores valores de $\Phi\Delta$ se consideran buenos fotosensibilizadores ya que generan oxígeno singlete de una manera más eficiente.

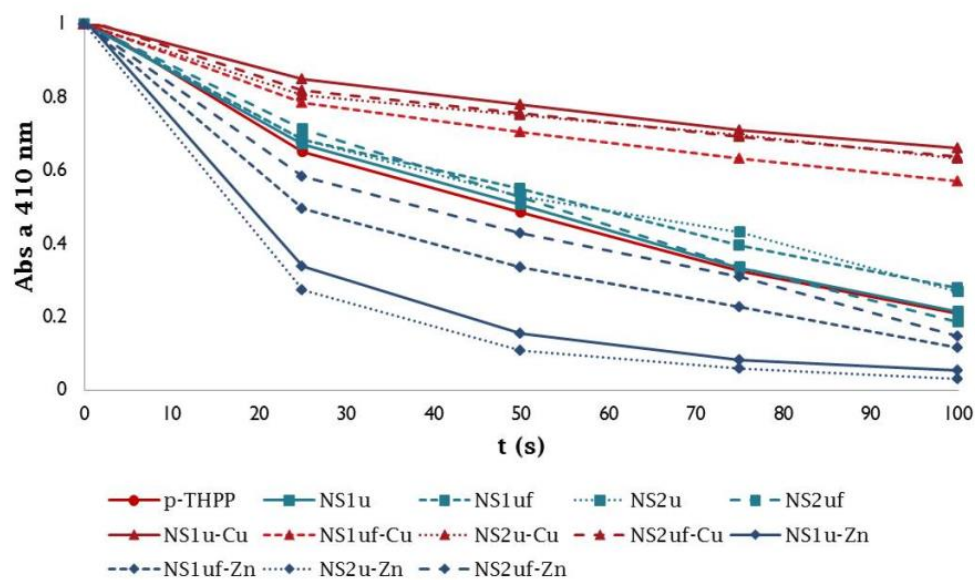


Figura 43. Comparación de las velocidades de fotodegradación del DPBF en metanol, usando las porfirinas y metaloporfirinas como fotosensibilizadores y la *p*-TPPH como referencia.

Tabla 4. Valores de rendimientos cuánticos de oxígeno singlete de las porfirinas y metaloporfirinas medidos en metanol.

Porfirina	$\Phi\Delta^a$	$k_{\text{exp}} \times 10^{-3}$
NS1u	0.47±0.05	6.3
NS2u	0.42±0.02	5.6
NS1uf	0.50±0.04	6.7
NS2uf	0.46±0.03	6.1
NS1u-Cu	0.21±0.04	2.8
NS2u-Cu	0.21±0.03	2.8
NS1uf-Cu	0.25±0.04	3.3
NS2uf-Cu	0.22±0.01	2.9
NS1u-Zn	0.66±0.02	8.9
NS2u-Zn	0.67±0.03	9
NS1uf-Zn	0.61±0.03	8.1
NS2uf-Zn	0.56±0.03	7.5

^a usando p-TPHH ($\Phi\Delta$ 0.56) como referencia.

3.3.2. Fototoxicidad y citotoxicidad intrínseca *in vitro* por WST-1.

3.3.2.1. Citotoxicidad intrínseca de las porfirinas.

Se determinó la citotoxicidad intrínseca de las porfirinas en células SiHa mediante el ensayo de WST-1, en la tabla 5 se muestran los resultados de citotoxicidad intrínseca de las porfirinas, éstos resultados son presentados en porcentajes de viabilidad y en la figura 44 se observan las curvas dosis-respuesta de la citotoxicidad intrínseca de las porfirinas. Las diferencias significativas fueron determinadas usando un análisis de varianza (ANOVA), Se consideró un $p < 0.05$ como significativo. Para los tratamiento con una concentración de 0.01 y 0.1 μM no hubo diferencia significativa, para todos los demás tratamientos hubo diferencia significativa. Se realizó la comparación de la prueba post hoc (Tukey) para la concentración de 5 μM , las porfirinas NS1uf y la NS2uf así como las porfirinas NS1u y NS2u no difieren significativamente.

Tabla 5. Citotoxicidad intrínseca de las porfirinas sobre células SiHa.

Porfirina	NS1u	NS2u	NS1uf	NS2uf
(μM)	% viabilidad \pm DE			
0.01	97.3 \pm 3.3	97.9 \pm 2.2	97.5 \pm 1.6	97.9 \pm 3.1
0.1	96.5 \pm 1.2	94.8 \pm 3.5	96.8 \pm 2.7	95.3 \pm 3.6
1	97.0 \pm 2.5 ^{ab}	91.0 \pm 2.2 ^{ac}	94.4 \pm 2.3 ^{ab}	88.2 \pm 2.7 ^{ac}
5	86.9 \pm 1.4 ^{ab}	86.0 \pm 2.1 ^{ab}	10.4 \pm 1.2 ^{ac}	9.0 \pm 1.6 ^{ac}
10	1.3 \pm 0.4 ^a	15.9 \pm 2.4 ^a	7.6 \pm 1.1 ^a	5.2 \pm 0.9 ^a

n=5, $p < 0.05$ comparación entre las porfirinas a una concentración, ANOVA, ^a difieren entre sí y prueba de comparaciones múltiples con Tukey, letra diferente ^{b, c} no difieren entre sí.

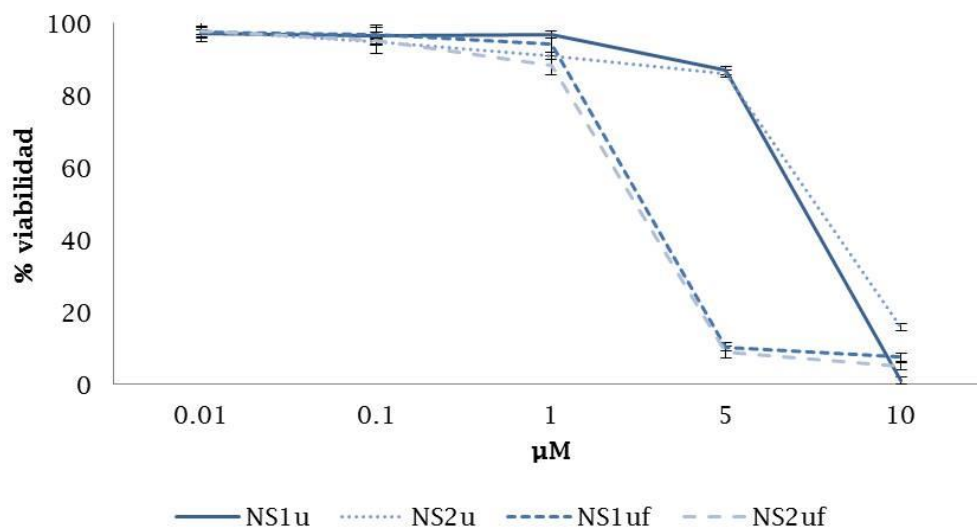


Figura 44. Citotoxicidad intrínseca de las porfirinas.

3.3.2.2. Citotoxicidad intrínseca de las metaloporfirinas.

Se determinó la citotoxicidad intrínseca de las metaloporfirinas en células SiHa mediante el ensayo de WST-1. En las tablas 6 y 7 se muestran los resultados de citotoxicidad intrínseca de las metaloporfirinas de cobre y zinc, respectivamente. Estos resultados son presentados en porcentajes de viabilidad y en la figura 45 se observan las curvas dosis-respuesta de las metaloporfirinas de cobre y en la figura 46 se observan las curvas dosis-respuesta de las metaloporfirinas de zinc. Las diferencias significativas fueron determinadas usando un análisis de varianza (ANOVA), Se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo. Todos los tratamientos presentaron diferencia significativa, tanto las metaloporfirinas de cobre como las de zinc. Se realizó la comparación de la prueba post hoc (Tukey) para la concentración de 5 μM , las porfirinas NS1u-Cu y la NS1uf-Cu no difieren significativamente y para las metaloporfirinas de zinc, las porfirinas NS1uf-Zn y NS2uf-Zn presentan medias iguales.

Tabla 6. Citotoxicidad intrínseca de las metaloporfirinas de cobre sobre células SiHa.

Porfirina	NS1u-Cu	NS2u-Cu	NS1uf-Cu	NS2uf-Cu
(μM)	% viabilidad \pm DE			
0.01	98.5 \pm 1.5 ^a	98.4 \pm 2.2 ^a	93.2 \pm 2.3 ^a	98.9 \pm 2.1 ^a
0.1	97.7 \pm 3.2 ^{ab}	95.1 \pm 2.1 ^{ab}	92.7 \pm 2.1 ^a	95.8 \pm 2.5 ^{ab}
1	94.6 \pm 2.1 ^a	81.5 \pm 2.6 ^a	88.6 \pm 3.6 ^{ab}	87.9 \pm 2.3 ^{ab}
5	86.8 \pm 1.6 ^{ab}	78.3 \pm 2.2 ^a	84.3 \pm 1.8 ^{ab}	58.6 \pm 3.0 ^a
10	14.2 \pm 2.0 ^a	4.7 \pm 1.0 ^{ab}	3.9 \pm 0.5 ^{ab}	5.9 \pm 1.7 ^{ab}

n=5, p<0.05 comparación entre las porfirinas a una concentración, ANOVA, ^a difieren entre sí y prueba de comparaciones múltiples con Tukey, letra diferente ^{b, c} no difieren entre sí.

Tabla 7. Citotoxicidad intrínseca de las metaloporfirinas de zinc sobre células SiHa.

Porfirina	NS1u-Zn	NS2u-Zn	NS1uf-Zn	NS2uf-Zn
(μM)	% viabilidad \pm DE			
0.01	97.2 \pm 1.7 ^{abc}	98.5 \pm 2.7 ^{abc}	95.2 \pm 2.0 ^{ac}	99.2 \pm 1.7 ^{ab}
0.1	94.7 \pm 2.7 ^{abc}	90.4 \pm 2.7 ^{ab}	91.8 \pm 2.5 ^{ab}	97.4 \pm 1.9 ^{ac}
1	91.4 \pm 2.4 ^{ab}	88.9 \pm 2.8 ^{ab}	88.7 \pm 2.5 ^{ab}	74.9 \pm 3.9 ^a
5	89.7 \pm 2.4 ^{ab}	86.0 \pm 2.4 ^{ab}	11.9 \pm 1.3 ^{ac}	11.7 \pm 1.6 ^{ac}
10	4.5 \pm 0.6 ^{ab}	6.5 \pm 1.0 ^{ac}	2.5 \pm 0.3 ^a	5.1 \pm 2.3 ^{abc}

n=5, p<0.05 comparación entre las porfirinas a una concentración, ANOVA, ^a difieren entre sí y prueba de comparaciones múltiples con Tukey, letra diferente ^{b, c} no difieren entre sí.

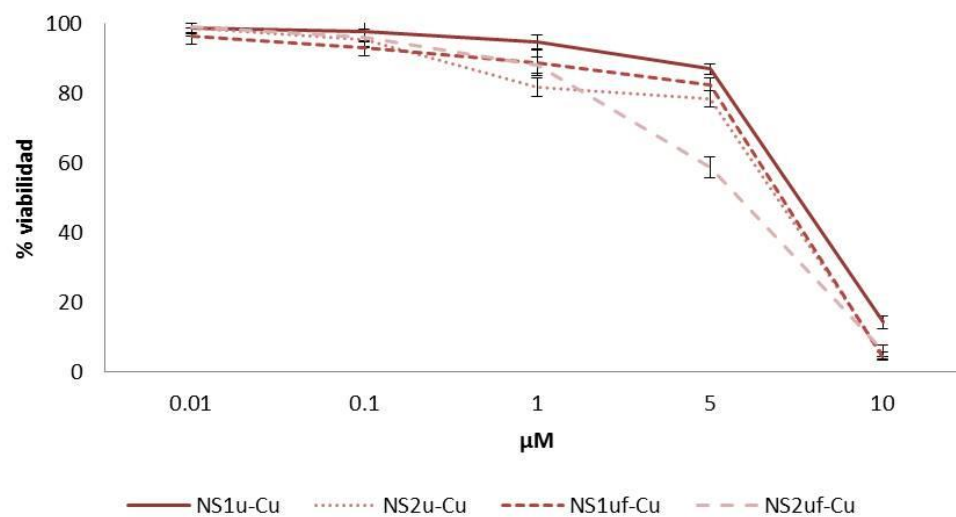


Figura 45. Citotoxicidad intrínseca de las metaloporfirinas de cobre.

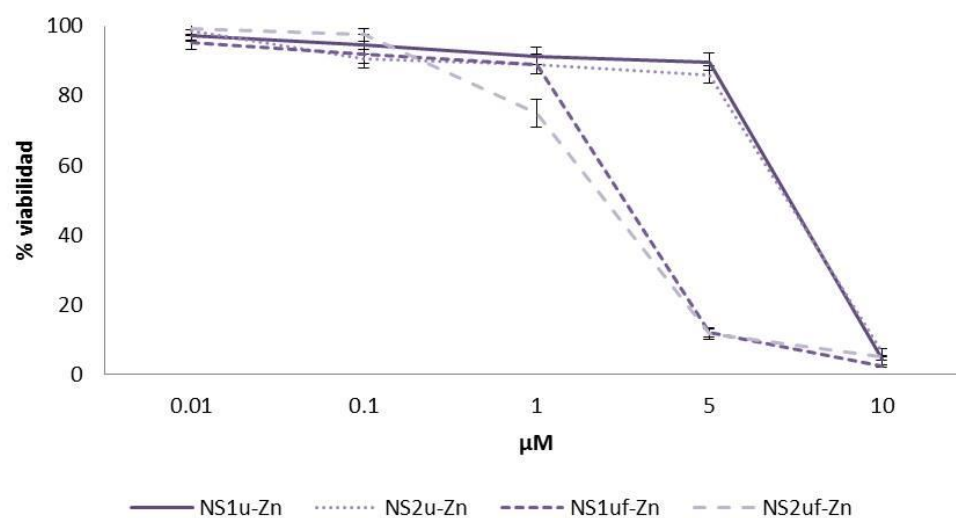


Figura 46. Citotoxicidad intrínseca de las metaloporfirinas de zinc.

3.3.2.3 Fototoxicidad de las porfirinas.

Se determinó la fototoxicidad de las porfirinas en células SiHa mediante el ensayo de WST-1. En la tabla 8 se muestran los resultados de fototoxicidad de las porfirinas, los resultados son presentados en porcentajes de viabilidad y en la figura 47 se muestran las curvas dosis-respuesta de la fototoxicidad de las porfirinas. Las diferencias significativas fueron determinadas usando un análisis de varianza (ANOVA), Se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo. Todos los tratamientos presentaron diferencia significativa. Se realizó la comparación de la prueba post hoc (Tukey) para la concentración de 0.1 μM , las porfirinas NS1u y la NS2u no difieren significativamente.

Tabla 8. Fototoxicidad de las porfirinas sobre células SiHa.

Porfirina	NS1u	NS2u	NS1uf	NS2uf
(μM)	% viabilidad $\pm\text{DE}^a$			
0.01	95.9 \pm 2.8 ^{ab}	92.1 \pm 3.6 ^{ab}	67.8 \pm 2.1 ^a	80.2 \pm 2.3 ^a
0.1	87.2 \pm 3.0 ^{ab}	84.8 \pm 1.8 ^{ab}	16.7 \pm 2.2 ^a	7.8 \pm 0.3 ^a
1	76.9 \pm 2.2 ^{ab}	78.7 \pm 1.9 ^{ab}	5.5 \pm 0.5 ^{ac}	5.1 \pm 1.3 ^{ac}
5	49.3 \pm 1.2 ^a	54.5 \pm 1.7 ^a	2.9 \pm 0.2 ^{ab}	2.5 \pm 0.2 ^{ab}
10	2.2 \pm 0.4 ^{ab}	2.0 \pm 0.4 ^{ab}	2.3 \pm 0.4 ^{ab}	3.9 \pm 0.3 ^a

n=5, $p < 0.05$ comparación entre las porfirinas a una concentración, ANOVA, ^a difieren entre sí y prueba de comparaciones múltiples con Tukey, letra diferente ^{b, c} no difieren entre sí.

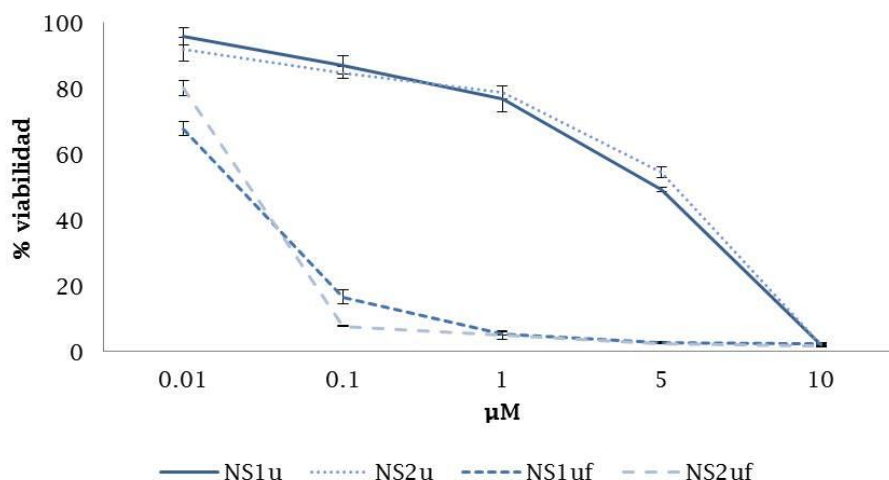


Figura 47. Fototoxicidad de las porfirinas.

3.3.2.4. Fototoxicidad de las metaloporfirinas.

Se determinó la fototoxicidad de las metaloporfirinas en células SiHa mediante el ensayo de WST-1. En las tablas 9 y 10 se muestran los resultados de fototoxicidad de las metaloporfirinas de cobre y zinc respectivamente, los resultados son presentados en porcentajes de viabilidad. En la figura 48 se muestran las curvas dosis-respuesta de las metaloporfirinas de cobre y en la figura 49 se observan las curvas dosis-respuesta de las metaloporfirinas de zinc. Las diferencias significativas fueron determinadas usando un análisis de varianza (ANOVA), Se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo. Todos los tratamientos presentaron diferencia significativa, tanto las metaloporfirinas de cobre como las de zinc. Se realizó la comparación de la prueba post hoc (Tukey) para la concentración de 1 y 0.1 μM para las metaloporfirinas de cobre y zinc, respectivamente, las porfirinas NS1u-Cu y la NS2uf-Cu no difieren significativamente y para las metaloporfirinas de zinc, las porfirinas NS1u-Zn y NS2u-Zn presentan medias iguales.

Tabla 9. Fototoxicidad de las metaloporfirinas de cobre sobre células SiHa.

Porfirina	NS1u-Cu	NS2u-Cu	NS1uf-Cu	NS2uf-Cu
(μM)	% viabilidad \pm DE			
0.01	94.3 \pm 3.3 ^{ab}	86.0 \pm 3.2 ^a	97.1 \pm 4.6 ^{ab}	94.6 \pm 2.2 ^{ab}
0.1	94.0 \pm 2.5 ^{ab}	79.0 \pm 2.3 ^a	90.0 \pm 3.7 ^{ab}	92.8 \pm 1.9 ^{ab}
1	83.9 \pm 4.0 ^{ab}	70.6 \pm 3.5 ^{ab}	17.3 \pm 2.8 ^a	85.5 \pm 2.5 ^{ab}
5	71.3 \pm 2.7 ^a	5.3 \pm 1.0 ^{ab}	2.2 \pm 0.3 ^a	5.5 \pm 0.5 ^{ab}
10	3.0 \pm 0.6 ^{abc}	4.0 \pm 0.4 ^{ab}	2.0 \pm 0.3 ^a	2.7 \pm 0.6 ^{ac}

n=5, p<0.05 comparación entre las porfirinas a una concentración, ANOVA, ^a difieren entre sí y prueba de comparaciones múltiples con Tukey, letra diferente ^{b, c} no difieren entre sí.

Tabla 10. Fototoxicidad de las metaloporfirinas de zinc sobre células SiHa.

Porfirina	NS1u-Zn	NS2u-Zn	NS1uf-Zn	NS2uf-Zn
(μM)	% viabilidad \pm DE ^a			
0.01	97.6 \pm 2.7 ^{ab}	97.7 \pm 3.7 ^{ab}	71.3 \pm 1.8 ^a	38.7 \pm 3.2 ^a
0.1	90.5 \pm 2.7 ^{ab}	91.6 \pm 1.2 ^{ab}	4.0 \pm 0.4 ^a	7.1 \pm 1.4 ^a
1	75.6 \pm 3.9 ^a	90.0 \pm 1.7 ^a	2.1 \pm 0.2 ^a	4.1 \pm 1.3 ^a
5	5.0 \pm 0.7 ^{ab}	5.8 \pm 1.0 ^{ab}	1.7 \pm 0.2 ^{ac}	2.1 \pm 0.2 ^{ac}
10	2.8 \pm 0.4 ^{ab}	3.0 \pm 0.6 ^{ab}	1.3 \pm 0.5 ^{ac}	1.6 \pm 0.2 ^{ac}

n=5, p<0.05 comparación entre las porfirinas a una concentración, ANOVA, ^a difieren entre sí y prueba de comparaciones múltiples con Tukey, letra diferente ^{b, c} no difieren entre sí.

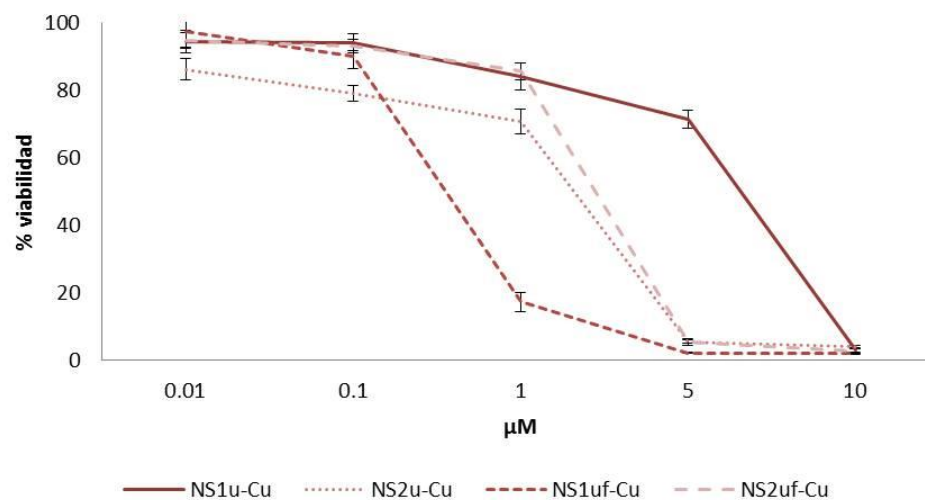


Figura 48. Fototoxicidad de las metaloporfirinas de cobre.

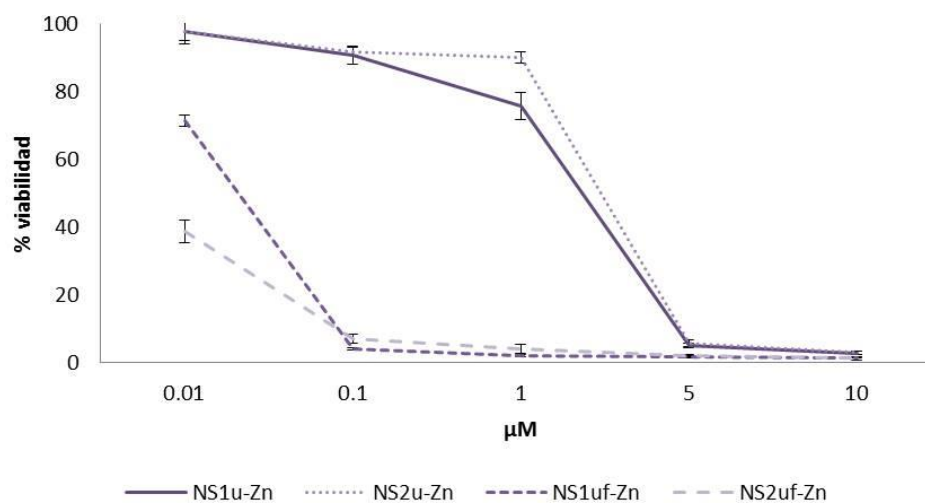


Figura 49. Fototoxicidad de las metaloporfirinas de zinc.

3.3.2.5. Determinación de la IC₅₀ de las porfirinas y metaloporfirinas.

Se determinaron las concentraciones a las cuales las células presentan una viabilidad celular del 50% (IC₅₀ por sus siglas en inglés), estas evaluaciones se realizaron extrapolando los resultados presentados en las curvas de dosis respuesta. Los valores de IC₅₀ se calcularon para todos los compuestos de estudio tanto para la citotoxicidad intrínseca como para la fototoxicidad. En la tabla 11 se muestran los resultados de IC₅₀ de las porfirinas y las metaloporfirinas.

Tabla 11. IC₅₀ de las porfirinas y las metaloporfirinas en células SiHa.

Porfirina	Citotoxicidad intrínseca	Fototoxicidad
	IC ₅₀ (μM)	
NS1u	7.2	5
NS2u	7.6	5.4
NS1uf	3.2	0.05
NS2uf	2.9	0.05
NS1u-Cu	7.5	6.5
NS2-Cu	6.8	2.2
NS1uf-Cu	7	0.6
NS2uf-Cu	5.8	2.7
NS1u-Zn	7.3	2.4
NS2u-Zn	7.3	2.9
NS1uf-Zn	3	0.03
NS2uf-Zn	2.6	<0.01

3.3.3. Apoptosis determinada por la actividad de caspasa-3.

Se determinó la actividad de la caspasa-3 en células SiHa después de ser tratadas con las porfirinas (NS1uf, NS2uf, NS1uf-Zn y NS2uf-Zn) a una concentración final de 10 μ M. Se usaron 50 μ g de lisado proteico para determinar la actividad de dicha enzima. La enzima caspasa-3 hidroliza el sustrato DEVD-pNA liberando la p-Nitroanilina lo cual es indicativo de la actividad de dicha enzima. En la tabla 12 y en la figura 50 se muestran los valores de absorbancia a 405 nm. La presencia de la enzima caspasa-3 indica un proceso apoptótico.

Tabla 12. Valores de absorbancia a 405 nm, indican la actividad de la enzima caspasa-3.

Tratamientos	Absorbancia \pm DE (405 nm)
NS1uf	0.298 \pm 0.027
NS2uf	0.373 \pm 0.011
NS1uf-Zn	0.328 \pm 0.033
NS2uf-Zn	0.384 \pm 0.021
Podofilotoxina	0.489 \pm 0.034
Negativo	0.117 \pm 0.006

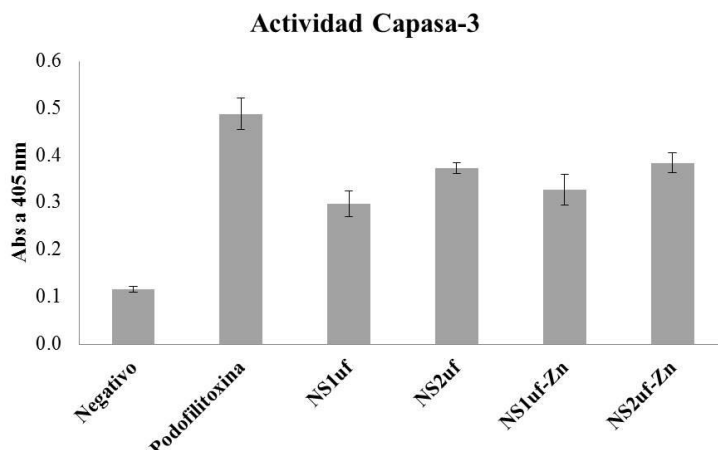


Figura 50. Valores de absorbancia a 405 nm, indican la actividad de la enzima caspasa-3.

3.3.4. Análisis de expresión génica diferencial (microarreglos de DNA).

Se determinó el análisis de expresión génica diferencial en células SiHa, se realizaron dos tratamientos con las porfirinas NS2uf-Cu y la N2uf-Zn, respectivamente, comparando la expresión con un control es decir sin tratamiento. En la figura 51 se muestra un gel de agarosa al 1%, donde se corrieron los RNA's obtenidos después de los tratamientos, se puede observar una buena integridad de los RNA's lo cual es esencial para el experimento. En la figura 52 se muestra un chip de DNA obtenido en este experimento.

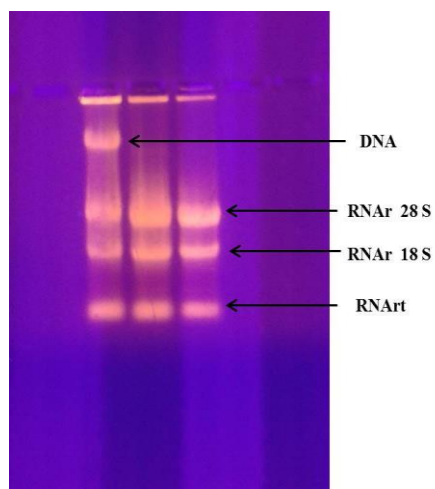


Figura 51. RNA's obtenidos y electro-forados en un gel de agarosa al 1%.

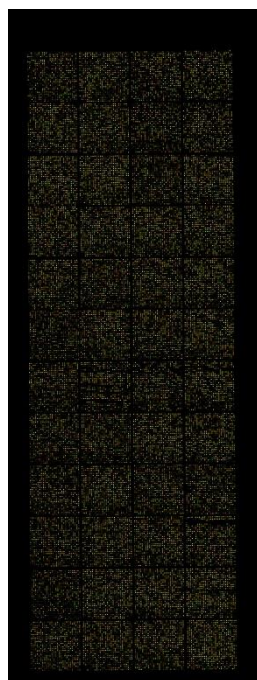


Figura 52. Chip de DNA.

El chip de DNA es escaneado para obtener así los genes sobreexpresados y reprimidos. Los genes con un z-score mayor o menor a ± 2 DE según sea el caso, se consideraron significativos para el análisis bioinformático. Para el tratamiento con la porfirina NS2uf-Cu se encontraron 113 genes reprimidos y 1882 genes sobreexpresados, mientras que para el tratamiento con la porfirina NS2uf-Zn se encontraron 45 genes reprimidos y 1841 genes sobreexpresados (ver figura 53).

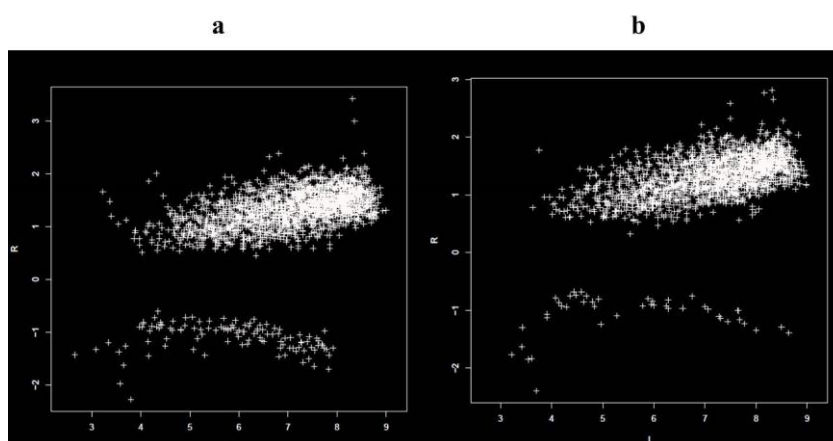


Figura 53. Genes reprimidos y sobreexpresados con un z-score ± 2 DE. a) tratamiento con la porfirina NS2uf-Cu, b) tratamiento con la porfirina NS2uf-Zn.

Se realizó un análisis bioinformático de los genes sobreexpresados y reprimidos con ayuda de la herramienta DAVID, esta herramienta asocia estos genes a sus vías metabólicas, con esto podemos observar los cambios en la expresión génica derivados del tratamiento. Para el tratamiento con la porfirina NS2uf-Cu, el programa arrojó 35 vías metabólicas implicadas para el caso de los genes sobreexpresados (ver figura 54 y tabla 13) y tres vías metabólicas para los genes reprimidos (ver figura 55 y tabla 14).

Term	RT	Genes	Count
Systemic lupus erythematosus	RT		20
Long-term potentiation	RT		10
Apoptosis	RT		11
Hedgehog signaling pathway	RT		8
Maturity onset diabetes of the young	RT		5
Ribosome	RT		10
Alzheimer's disease	RT		15
MAPK signaling pathway	RT		22
Endocytosis	RT		16
Axon guidance	RT		12
Calcium signaling pathway	RT		15
Chronic myeloid leukemia	RT		8
Prion diseases	RT		5
Insulin signaling pathway	RT		12
Glutathione metabolism	RT		6
Vascular smooth muscle contraction	RT		10
Non-small cell lung cancer	RT		6
Long-term depression	RT		7
Melanogenesis	RT		9
Natural killer cell mediated cytotoxicity	RT		11
Huntington's disease	RT		14
Dilated cardiomyopathy	RT		8
T cell receptor signaling pathway	RT		9
Basal transcription factors	RT		4
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	RT		5
Tight junction	RT		10
ErbB signaling pathway	RT		7
Gap junction	RT		7
Dorso-ventral axis formation	RT		3
Pathways in cancer	RT		21
VEGF signaling pathway	RT		6
B cell receptor signaling pathway	RT		6
Heparan sulfate biosynthesis	RT		3
Parkinson's disease	RT		9
Glioma	RT		5

Figura 54. Vías metabólicas mostradas por DAVID, donde los genes sobreexpresados tienen implicación (tratamiento con la porfirina NS2uf-Cu).

Tabla 13. Algunas vías metabólicas y los genes sobreexpresados para cada vía.
(tratamiento con la porfirina NS2uf-Cu).

Vía metabólica	Genes sobreexpresados
Apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> • BCL-2 asociado a la proteína X • Factor de fragmentación de DNA 40kDa • Factor de fragmentación de DNA 45kDa • Caspasa-6 • Inhibidor de promotor de gen del polipéptido ligera kappa en células B • Proteína quinasa ligada al cromosoma X • Proteína quinasa dependiente de cAMP • Proteína fosfatasa 3 • Receptor del factor de necrosis tumoral
Vía de señalización MAPK	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína 4 guanil liberadora RAS • Proteína específica 1 factor de liberador de nucleótido guanina RAS • Arrestina • Canal de calcio voltaje dependiente • Factor de crecimiento de fibroblastos 21 • Factor de crecimiento de fibroblastos 3 • Detención del crecimiento y daño de ADN-inducible • Proteína 7 heat shock 70kDa • Inhibidor de promotor de gen del polipéptido ligera kappa en células B • Proteína tau asociada a los microtúbulos • Fosfolipasa A2 • Proteína quinasa ligada al cromosoma X • Proteína fosfatasa 3 • Proteína tirosina fosfatasa • Serina/treonina quinasa 3 • Sarcoma de rata Harvey

Vía metabólica	Genes sobreexpresados
	homólogo de oncogén viral
Vía de señalización Hedgehog	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína de dedos de zinc GLI • Indian hedgehog homologo • Proteína 4 hueso morfogénico • Caseína quinasa 1 • Sonic hedgehog homologo
Ribosoma	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína mitocondrial ribosomal L13 • Proteína ribosomal L18 • Proteína ribosomal L19 • Proteína ribosomal L23a • Proteína ribosomal L27 • Proteína ribosomal S18 • Proteína ribosomal ubiquitin A-52
Vía de señalización del calcio	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor 7 de serotonina • ATPasa, Ca ++ de transporte, el músculo cardíaco, de contracción rápida 1 • Complejo locus GNAS • Receptor adrenérgico alfa • Receptor adrenérgico beta • Canal de calcio voltaje dependiente • Calmodulina-6 • Receptor de endotelio tipo B • Receptor glutamato • Proteína fosfatasa-3
Metabolismo del glutatión	<ul style="list-style-type: none"> • Glutati3n peroxidasa 4 • Glutati3n peroxidasa 5 • Glutati3n peroxidasa 7 • Isocitrato deshidrogenasa 2 • Ornitina descarboxilasa 1 • Espermina sintasa
Vía de señalización VEGF	<ul style="list-style-type: none"> • SHC transformaci3n de prote3na 1 • Fosfolipasa A2 • Prote3na fosfatasa 3 • Sarcoma de rata Harvey hom3logo de oncog3n viral
V3as en el c3ncer	<ul style="list-style-type: none"> • BCL-2 asociado a la prote3na X • Prote3na de uni3n 2 C-terminal

Vía metabólica	Genes sobreexpresados
	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína de dedos de zinc GLI • RAS • Proteína 4 hueso morfogénico • Oncogen 1 c-abl • Catenina • Inhibidor quinasa 2B ciclina dependiente • Egl nueve homólogo 1 • Factor de crecimiento de fibroblastos 21 • Factor de crecimiento de fibroblastos 3 • Receptor nuclear coactivador 4 • Receptor de ácido retinoico beta • Sonic hedgehog homólogo
Endocitosis	<ul style="list-style-type: none"> • ADP-ribosilación proteína activadora de GTPasa factor 1 • RAB11B • SH3-domain-GRB2 endophilin B2 • Receptor adrenérgico beta 1 • Arrestina • Clatrina • Dinamina 2 • Epsina 1 • Proteína 7 heat shock 70kDa • Quinasa 5 fofatidilinositol-4 fosfatasa • Proteína vacuolar clasificación 24
Long-term potentiation	<ul style="list-style-type: none"> • Calmodulina • Receptor de glutamato • Proteína fosatasa 3 • Proteína quinasa ligada al cromosoma X
Lupus eritematoso sistémico	<ul style="list-style-type: none"> • Histona H2A miembro B3 • Histona H2A miembro X • Histona H2A miembro Y2 • Histona H2A miembro Z • Complemento componente 1

Vía metabólica	Genes sobreexpresados
	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor de glutamato • Histona cluster 1 • Histona cluster 3
Alzheimer	<ul style="list-style-type: none"> • NADH deshidrogenasa ubiquitina alfa • NADH deshidrogenasa ubiquitina beta • Calmodulina 6 • Receptor de glutamato • Proteína asociada al receptor de la lipoproteína de baja densidad • Proteína tau asociada a microtúbulos • Fosfatasa proteína 3 • Complejo succinato deshidrogenasa • Ubiquinol-citocromo C oxidasa



Term	RT	Genes	Count
mTOR signaling pathway	RT		3
Fc gamma R-mediated phagocytosis	RT		2
Insulin signaling pathway	RT		2

Figura 55. Vías metabólicas mostradas por DAVID, donde los genes reprimidos tienen implicación (tratamiento con la porfirina NS2uf-Cu).

Tabla 14. Algunas vías metabólicas y los genes reprimidos para cada vía. (tratamiento con la porfirina NS2uf-Cu).

Vía metabólica	Genes sobreexpresados
Vía de señalización mTOR	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína quinasa ribosomal S6 polipéptido 3 • Proteína quinasa ribosomal S6 polipéptido • Factor de crecimiento vascular endotelial
Vía de señalización de insulina	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína quinasa activada por AMP • Proteína quinasa ribosomal S6
Receptor Fc gamma, media fagocitosis	<ul style="list-style-type: none"> • Dinamina 1 • Proteína quinasa ribosomal S6

Para el tratamiento con la porfirina NS2uf-Zn, el programa arrojó 42 vías metabólicas implicadas para el caso de los genes sobreexpresados (ver figura 56 y tabla 15) y para los genes reprimidos el programa no encontró interacción en alguna vía metabólica. En la figura 57 se puede observar un ejemplo de los genes sobreexpresados en la vía de señalización MAPK.


Term	RT	Genes	Count
Systemic lupus erythematosus	RT		16
MAPK signaling pathway	RT		25
Calcium signaling pathway	RT		17
Prion diseases	RT		6
Vascular smooth muscle contraction	RT		12
Apoptosis	RT		10
Long-term depression	RT		8
Hedgehog signaling pathway	RT		7
Ribosome	RT		9
Fructose and mannose metabolism	RT		5
Proteasome	RT		6
Insulin signaling pathway	RT		12
Adipocytokine signaling pathway	RT		7
Heparan sulfate biosynthesis	RT		4
Long-term potentiation	RT		7
Melanogenesis	RT		9
Arachidonic acid metabolism	RT		6
RIG-I-like receptor signaling pathway	RT		7
Phosphatidylinositol signaling system	RT		7
Endocytosis	RT		14
Chronic myeloid leukemia	RT		7
Dilated cardiomyopathy	RT		8
T cell receptor signaling pathway	RT		9
Neurotrophin signaling pathway	RT		10
Type II diabetes mellitus	RT		5
Pathways in cancer	RT		22
Ether lipid metabolism	RT		4
Base excision repair	RT		4
GnRH signaling pathway	RT		8
Non-small cell lung cancer	RT		5
Inositol phosphate metabolism	RT		5
Melanoma	RT		6
Gap junction	RT		7
Maturity onset diabetes of the young	RT		3
Dorso-ventral axis formation	RT		3
VEGF signaling pathway	RT		6
Starch and sucrose metabolism	RT		4
Bladder cancer	RT		4

Figura 56. Vías metabólicas mostradas por DAVID, donde los genes sobreexpresados tienen implicación (tratamiento con la porfirina NS2uf-Zn).

Tabla 15. Algunas vías metabólicas y los genes sobreexpresados para cada vía.
(tratamiento con la porfirina NS2uf-Cu).

Vía metabólica	Genes sobreexpresados
Apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> • BCL-2 asociado a la proteína X • Factor de fragmentación de DNA 40kDa • Factor de fragmentación de DNA 45kDa • Interleucina 1 • Inhibidor de promotor de gen del polipéptido de las cadenas ligeras kappa en células B • Proteína quinasa dependiente de cAMP • Proteína fosfatasa 3 • Receptor del factor de necrosis tumoral
	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína 4 guanil liberadora RAS • Proteína específica 1 factor de liberador de nucleótido guanina RAS • Receptor del factor de necrosis tumoral • Arrestina • Canal de calcio voltaje dependiente • Factor de crecimiento de fibroblastos 21 • Interleucina 1 • Detención del crecimiento y daño de ADN-inducible • Proteína 7 heat shock 70kDa • Inhibidor de promotor de gen del polipéptido ligera kappa en células B • Protooncogen jun-D • Activador mitógeno factor 2C • Receptor nuclear subfamilia 4 • Fosfolipasa A2 • Proteína fosfatasa 3
Vía de señalización MAPK	

Vía metabólica	Genes sobreexpresados
	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína tirosina fosfatasa • Serina/treonina quinasa 3 • Sarcoma de rata Harvey homólogo de oncogén viral
Vía de señalización Hedgehog	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína de dedos de zinc GLI • Indian hedgehog homólogo • Proteína 4 hueso morfogénico • Caseína quinasa 1
Ribosoma	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína mitocondrial ribosomal L13 • Proteína ribosomal L18 • Proteína ribosomal L36 • Proteína ribosomal L27 • Proteína ribosomal S18 • Proteína ribosomal ubiquitin A-52
Vía de señalización del calcio	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor 5A de serotonina • Receptor 7 de serotonina • ATPasa, Ca⁺⁺ de transporte, el músculo cardíaco, de contracción rápida 1 • Complejo locus GNAS • Receptor adrenérgico alfa • Receptor adrenérgico beta • Canal de calcio voltaje dependiente • Calmodulina-6 • Receptor de endotelio tipo B • Fosfolipasa C • Receptor 3 de prostaglandinas • Proteína fosfatasa-3
Vía de señalización VEGF	<ul style="list-style-type: none"> • Paxilina • Fosfolipasa A2 • Proteína fosfatasa 3 • Sarcoma de rata Harvey homólogo de oncogén viral
Vías en el cáncer	<ul style="list-style-type: none"> • BCL-2 asociado a la proteína X • Proteína de unión 2 C-terminal

Vía metabólica	Genes sobreexpresados
	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína de dedos de zinc GLI • RAS • Receptor del factor de necrosis tumoral • Proteína 4 hueso morfogénico • Oncogen 1 c-abl • Proteína quinasa asociada a la muerte • Egl nueve homolog 1 • Factor de crecimiento de fibroblastos 21 • Factor de crecimiento de fibroblastos 3 • Fibronectina 1
Endocitosis	<ul style="list-style-type: none"> • RAB11B • SH3-domain-GRB2 endophilin B2 • Receptor adrenérgico beta 1 • Dinamina 1 • Dinamina 2 • Proteína 7 head shock 70kDa • Quinasa 5 fofatidilinositol-4 fosfatasa • Proteína vacuolar clasificación 24
Long-term potentiation	<ul style="list-style-type: none"> • Complejo locus GNAS • Fosfilapasa A2 • Sarcoma de rata Harvey homólogo de oncogén viral • Receptor de glutamato
Lupus eritematoso sistémico	<ul style="list-style-type: none"> • Histona H2A miembro Y2 • Histona cluster 1 • Histona cluster 2 • Histona cluster 3
Unión Gap	<ul style="list-style-type: none"> • Complejo locus GNAS • Receptor adrenérgico beta • Receptor de glutamato • Proteína quinasa dependiente de cAMP • Proteína dependiente de cGMP • Sarcoma de rata Harvey homólogo de oncogén viral

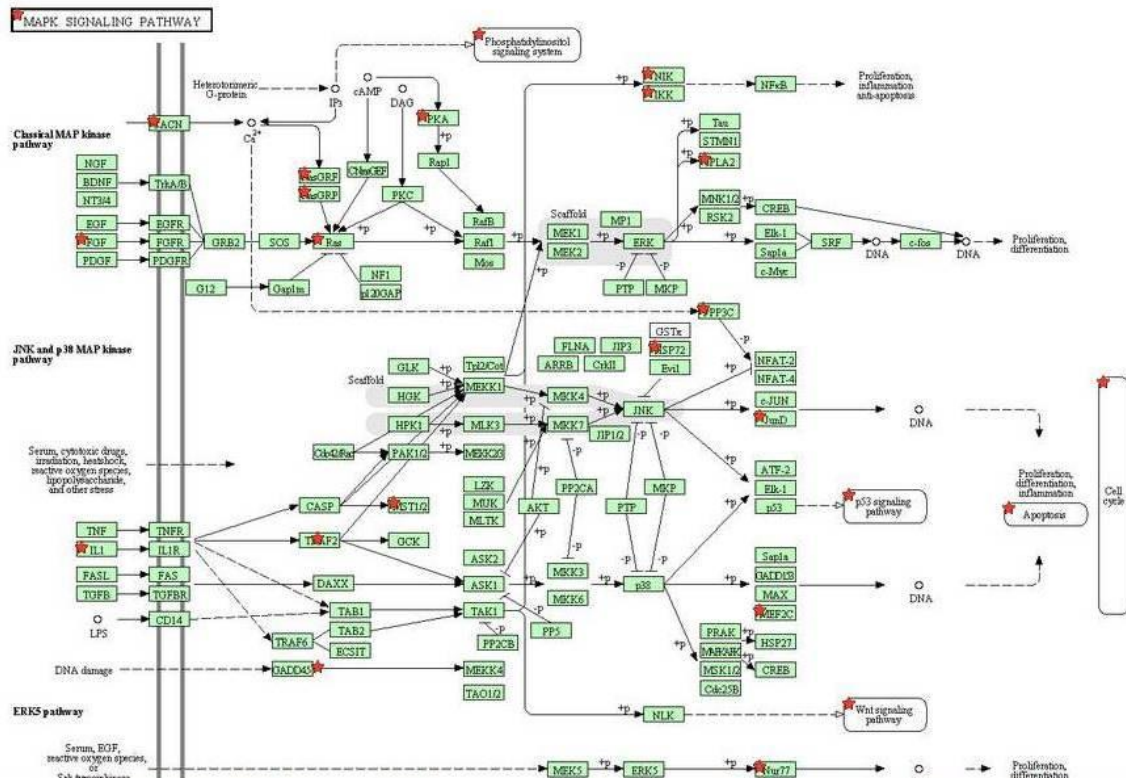


Figura 57. Genes sobreexpresados en la vía metabólica MAPK (tratamiento con NS2uf-Zn).

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN.

Las porfirinas NS1u y NS2u fueron sintetizadas y purificadas obteniendo un rendimiento de 24 y 20%, respectivamente. Para la obtención de las porfirinas funcionalizadas con glutamato se propuso la siguiente ruta sintética que incluye primero la reacción de acoplamiento entre ácido 4-formil benzoico y el 2-aminopentanodioato de dimetilo siguiendo las condiciones típicas para la formación de amidas (Esquema 1) [60]. Se obtuvo el 2-(4-formilbenzamido)-pentanodioato de dimetilo con un rendimiento de 33%, el cual se considera bajo, esto es atribuido a que compite con la formación de la base de Schiff; sin embargo, la cantidad de compuesto generado fue suficiente para realizar la síntesis de porfirinas. El dimetil-2-aminopentanodioato fue sintetizado previamente por la esterificación del ácido L-glutámico, usando cloruro de tionilo para obtener el correspondiente dicloruro, seguido de la esterificación con el metanol, se esterificó para evitar la polimerización [61], los datos espectrales para este producto están de acuerdo con los descritos anteriormente.

Una vez que el 2-(4-formilbenzamido)-pentanodioato de dimetilo fue generado, se concluyó la ruta sintética para producir las porfirinas NS1uf y NS2uf con un rendimiento de 6 y 5% respectivamente, siguiendo el procedimiento de Lindsey y cols., [53]. Estos rendimientos fueron bajos debido principalmente a que las porfirinas funcionalizadas presentaron una polaridad similar a los subproductos de la reacción así como al DDQ sin reaccionar, lo que complicó su purificación. Cabe señalar, que en general para el método de Lindsey han sido reportados rendimientos bajos de alrededor del 20% [50, 51].

Este procedimiento es diferente de otros informes en los que las porfirinas funcionalizados se sintetizan primero mediante la obtención de la porfirina base libre y luego se realizan diversas funcionalizaciones, a veces se tienen desventajas relacionadas con la reactividad de los otros sustituyentes *meso* o con la propia porfirina [62-65]. La ruta presentada aquí podría tener la ventaja de identificar el grupo de funcionalización desde el principio y así continuar con la formación de la porfirina de una forma más sencilla. Se sintetizaron y caracterizaron cuatro porfirinas no simétricas del tipo A₃B (NS1u, NS1uf, NS2u y NS2uf), logrando en dos de ellas la funcionalización con L-glutamato (NS1uf y NS2uf), con lo que se consiguió aumentar su actividad fototóxica, lo cual fue comprobado una vez realizados los experimentos correspondientes, mostrando un aumento considerable.

Es importante tener en cuenta el aumento de la polaridad de las porfirinas NS1uf y NS2uf en comparación con NS1u y NS2u como se observó por los R_f en la cromatografía en placa con una fase móvil de diclorometano e isopropanol (98:2), NS1u (R_f 0.75), NS2u (R_f 0.64), NS1uf (R_f 0.35) NS2uf (R_f 0.22). El aumento de la polaridad de estas porfirinas que tienen L-glutamato en la estructura como sustituyente en posición *meso*, parece ser importante debido al efecto sobre el equilibrio entre la hidrofiliidad/hidrofobicidad, la funcionalización puede también aumentar la captación celular y direccionar los fotosensibilizadores hacia las células tumorales [38, 66, 67].

Las propiedades hidrofílicas/hidrofóbicas se pueden caracterizar por el coeficiente de partición (P) de los compuestos entre dos solventes inmiscibles como n-octanol y agua [68]. Los coeficientes de partición en base logaritmo (logP) fueron determinados para las porfirinas usando el programa chemdraw, logP 9.74, 9.91, 8.28 y 7.35, para las porfirinas NS1u, NS2u, NS1uf y NS2uf, respectivamente, se puede ver el aumento del carácter hidrofílico de las porfirinas funcionalizadas, con esto se esperaba aumentar la actividad fototóxica lo cual fue comprobado con los ensayos de fototoxicidad, mostrando un aumento considerable. Las porfirinas metaladas de zinc (II) y cobre (II) fueron obtenidas para todas las porfirinas de base libre (ver esquema 3, página 27). Las metaloporfirinas se purificaron en columna obteniéndose rendimientos entre 44 y 85 %.

Las porfirinas fueron caracterizadas por RMN de protón. Todas presentaron una señal entre -2 y -3 ppm que es característica de los protones de los grupos NH dentro del anillo porfirínico que se encuentran altamente apantallados, debido al sistema de electrones π deslocalizados en el macrociclo de la porfirina. También todas presentaron señales a campos bajos de los protones β pertenecientes a los pirroles debido a la desprotección que sufren por la corriente en el anillo porfirínico [69]. Igualmente se observan señales para los protones de los metoxilos cerca de 4 ppm, las señales de protones fenílicos en desplazamientos que van desde 7 hasta 8.5 ppm.

Se obtuvieron los espectros de absorción UV-Vis correspondientes de las porfirinas, presentando el patrón característico de las porfirinas de base libre, un pico alrededor de 420 nm que implica una fuerte transición desde el estado fundamental al segundo estado excitado ($S_0 \rightarrow S_2$) y la banda correspondiente se denomina Soret o banda B, después se observó una débil transición para el primer estado excitado ($S_0 \rightarrow S_1$) en el intervalo entre 500-750nm llamadas bandas Q [52]. Los compuestos en el estudio presentaron este patrón característico por lo tanto se pueden designar como porfirinas. También se obtuvieron los espectros de absorción UV-Vis correspondientes a las metaloporfirinas, presentando el patrón característico de éstas, la ausencia de dos bandas Q debido a la simetría rectangular que introduce el metal [70].

4.2. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FOTODINÁMICAS.

Las porfirinas y metaloporfirinas presentaron valores de $\Phi\Delta$ que van de 0.21 a 0.67, las metaloporfirinas de cobre presentaron los valores más bajos de $\Phi\Delta$, esto es debido a que los metales paramagnéticos desactivan los estados excitados y acortan los tiempos de vida del estado triplete, mientras que las metaloporfirinas de zinc presentaron los valores más altos de $\Phi\Delta$, ya que aumenta el cruce entre sistemas y tiempo de vida del estado triple, atribuido al metal diamagnético [52].

Las metaloporfirinas de zinc presentaron los valores más altos de oxígeno singlete; estos valores son similares con otras porfirinas y metaloporfirinas presentadas por otros autores, Cheng-Liang y cols. [30], reportaron valores de $\Phi\Delta$ entre 0.45 y 0.68 para porfirinas simétricas y no simétricas con sustituyentes *meso p*-hidroxifenil y *p*-aminofenil y Nifiatis y cols. [71], reportaron tetrarilporfirinas halógenas en el grupo *meso*-fenil con valores de $\Phi\Delta$ entre 0.63 y 0.96. En general a mayor valor de $\Phi\Delta$ se considera un mejor fotosensibilizador y por lo tanto se esperaba que presentaran una mejor actividad fototóxica y en efecto mostraron una mayor actividad fototóxica, lo cual fue corroborado para los compuestos en estudio. El aumento en el rendimiento cuántico de oxígeno singlete puede atribuirse al aumento de la hidrofiliidad [72, 73].

Las porfirinas funcionalizadas y sus correspondientes metaladas con zinc presentaron los valores de citotoxicidad intrínseca más altos, esto puede ser atribuido a una mayor captación celular [30]. Al comparar la actividad fototóxica de las porfirinas, se puede observar que la funcionalización de las porfirinas con glutamato aumentó 100 veces la actividad fototóxica (NS1u (IC_{50} 5 μ M), NS1uf (IC_{50} 0.05 μ M) y NS2u (IC_{50} 5.4 μ M), NS2uf (IC_{50} 0.05 μ M)). Este aumento en la actividad puede ser atribuido a la disminución de la hidrofobicidad, una mayor captación celular y al aumento del $\Phi\Delta$, lo cual es dado por la funcionalización con glutamato, se ha reportado que la adición de sustituyentes hidrofílicos aumenta la captación celular y pueden direccionar los fotosensibilizadores hacia las células tumorales [30, 37].

La metalación con zinc aumentó la actividad fototóxica comparada con sus porfirinas correspondientes. La metalación con cobre disminuyó la actividad fototóxica comparada con sus porfirinas correspondientes. Las metaloporfirinas NS1uf-Zn (IC_{50} 0.03 μ M) y NS2uf-Zn ($IC_{50} < 0.01$ μ M) presentaron los mejores valores de actividad fototóxica, mientras que las porfirinas NS1uf y N2uf presentaron valores de actividad fototóxica con un IC_{50} de 0.05 μ M. Por lo tanto la funcionalización y la metalación con zinc aumentaron la actividad fototóxica. En general las porfirinas y metaloporfirinas con los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete más altos mostraron los mejores resultados de actividad fototóxica.

Los resultados de fototoxicidad presentados en este trabajo son similares a porfirinas sintetizadas y evaluadas por otros autores. En un estudio presentado por Banfi y cols., [50], se sintetizaron siete tetraaril porfirinas con sustituyentes *meso* hidroxifenilos y metoxifenilos y se evaluó su actividad fototóxica en células HTC 116 de carcinoma colorectal, obteniendo valores de IC_{50} que oscilan entre 0.004 y 13 μ M; Se compararon los valores de fototoxicidad contra el Photofrin®, el cual presentó un IC_{50} de 0.073 μ g/ml. En otro estudio presentado por Banerjee y cols., [74] reporta un valor de IC_{50} de 4.3 μ M para el Photofrin® sobre células HeLa. De estos resultados podemos deducir que las porfirinas NS1uf y NS2uf y las metaloporfirinas NS1uf-Zn y NS2uf-Zn son más fototóxicas que el Photofrin®.

También se ha reportado la actividad de otros fotosensibilizadores, la p-THPP presenta un IC_{50} de 0.0045 μM sobre células HTC 116 [43] y la temoporfinina un IC_{50} de 0.0076 μM sobre las mismas células [51], que son dos de los fotosensibilizadores más fototóxicos. El hecho de que la metaloporfirina NS2uf-Zn presente un $IC_{50} < 0.01$ en células SiHa la convierte en un agente FS prometedor al acercarse a estos valores.

Kralova y cols., [37] sintetizaron porfirinas funcionalizadas con glicol y evaluaron su actividad en células HL60 de leucemia y células 4T1 de cáncer de mama, con valores de IC_{50} que van desde 0.033 hasta 0.093 μM y 0.093 hasta 0.143 μM respectivamente, en otro estudio presentado por Laville y cols., [75] sintetizaron y evaluaron porfirinas glicosiladas en células de retinoblastoma con valores de IC_{50} entre 0.06 y 0.65 μM , estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo.

En un estudio de Shabani y Ghammamy [76] sintetizaron dos metaloporfirinas con vanadio y cobre, y evaluaron su fototoxicidad en dos líneas celulares tumorales con valores de IC_{50} entre 8 y 10 μM y en otro estudio presentado por Tovmasyan y cols., [77] evaluaron la fototoxicidad de varias metaloporfirinas en células KCL-22 mieloide, la metaloporfirina de zinc fue la más activa con un IC_{50} de 5 μM , las metaloporfirinas de zinc obtenidas en nuestro proyecto (NS1uf-Zn y NS2uf-Zn) son más fototóxicas que las presentadas en los trabajos antes mencionados.

En cuanto a los resultados obtenidos del ensayo de identificación de apoptosis, las células SiHa tratadas con las porfirinas NS1uf, NS2uf, NS1uf-Zn y NS2uf-Zn a una concentración final de 10 μ M, presentaron una mayor actividad de la enzima caspasa-3 comparada con el control negativo, pero menor comparada con el tratamiento con la podofilotoxina; se observó la actividad de la caspasa-3 lo que nos indica la presencia de apoptosis. La muerte celular programada es muy a menudo relacionada con la pérdida de la función de la mitocondria, que es reflejada por una disminución en el potencial de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo C. Se sabe que la acumulación de ROS puede ser una causa de la alteración de la función mitocondrial. Algunos reportes han documentado la presencia de apoptosis (Banfi y cols. 2004 [50], Szurko y cols. 2003 [78], Wawrzynska y cols. 2010 [79]) generada por el tratamiento de diferentes agentes fotosensibilizadores, por lo cual los resultados obtenidos en esta investigación están en concordancia con estos estudios.

Las células en apoptosis se caracterizan por un encogimiento celular, mientras tanto los organelos y la membrana plasmática conservan su integridad durante un período largo, las células se fragmentan en cuerpos apoptóticos. En última instancia, los cuerpos apoptóticos son ingeridos por las células fagocitarias, de esta forma se previene la inflamación. La apoptosis requiere de la activación de endonucleasas, la degradación del DNA y la activación de las caspasas. A dosis bajas de la TFD, las células exhiben una capacidad mayor a morir en forma apoptótica, porque a dosis altas de la TFD puede inactivar fotoquímicamente enzimas esenciales y otros componentes de la cascada apoptótica [80].

Inoue y cols., observaron que el tratamiento con el ácido 5-aminolevulínico disminuyó los niveles de potencial de membrana mitocondrial y causó la muerte celular principalmente por apoptosis [81], Tochigi y cols., mencionan que a bajas concentraciones de H_2O_2 se activa preferentemente la vía apoptótica caspasa-dependiente, mientras que a altas concentraciones de H_2O_2 induce la muerte celular apoptótica y necrótica independiente de caspasas [82], también el óxido nítrico está involucrado en la terapia fotodinámica, ya que puede estimular o inhibir la apoptosis, actuando sobre la vía NF- κ B/Snail/RKIP survival/anti-apoptotic loop, donde dosis bajas de TFD induce niveles bajos de óxido nítrico lo que provoca la estimulación de la vía anti-apoptótica antes mencionada, mientras que a dosis altas de la TFD estimula los niveles altos del óxido nítrico lo que inhibe la vía y por lo tanto estimula la apoptosis [83].

Kessel menciona que la sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 conduce a la estabilización de la proteína pro-apoptótica Bax. Después del fotodaño, el exceso de Bax, está disponible para iniciar la interacción con la membrana mitocondrial, lo que resulta en la liberación de citocromo C; un disparador de la apoptosis [84], por lo tanto, los factores cruciales en la determinación del tipo de muerte celular, después de la TFD son: el tipo de célula, la localización subcelular de la FS, y la dosis de luz para activar al FS [85, 86].

En los estudios de análisis de expresión génica se compararon dos tratamientos uno con la porfirina más fototóxica (NS1uf-Zn) y uno con una de las porfirinas menos fototóxicas (NS2uf-Cu). Después del análisis bioinformático con la herramienta DAVID, podemos mencionar que los tratamientos presentaron un patrón de expresión génico similar en cuanto a los genes sobreexpresados ya que comparten cerca de 10 vías metabólicas (Apoptosis, vía de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés), vía de señalización Hedgehog, ribosomas, vía de señalización del calcio, vía de señalización de factor de crecimiento endotelial (VEGF por sus siglas en inglés) y vías del Cáncer, Alzheimer) y una gran cantidad de genes. En cuanto a los genes reprimidos podemos mencionar que se encontraron pocos genes.

Con esta evidencia se puede sugerir que el mecanismo por el cual los tratamientos tienen su actividad citotóxica es similar, por lo tanto la diferencia en la actividad fototóxica de los dos tratamientos puede deberse a otros factores como, el rendimiento cuántico de oxígeno singlete debido a la naturaleza química del metal, el *logP*, la captación celular, entre otros, y no al mecanismo por el cual llevan a cabo su actividad citotóxica. Sin embargo, sabemos que los resultados de microarreglos tienen un carácter cualitativo y los resultados tienen que ser verificados por una técnica cuantitativa como por ejemplo la PCR en tiempo real.

Se encontró la sobreexpresión del gen de células B de linfoma 2 (Bcl-2 por sus siglas en inglés), algunos estudios han reportado la sobreexpresión de este gen después del tratamiento con la TFD [32, 85, 87], la familia de genes Bcl-2 controlan la permeabilidad de la membrana externa después de la lesión fotodinámica, también inducen la liberación de citocromo C y por lo tanto induce la apoptosis [35, 84]. Otro gen sobreexpresado involucrado en la apoptosis es el receptor del factor de necrosis tumoral, la vía de señalización de este receptor asociado a FAS y APO2/TRIAL induce apoptosis con un mecanismo independiente de p-53 [80].

Los genes sobreexpresados (factor de fragmentación de DNA 40 kDa y 45 kDa) son nucleasas que median la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina durante la apoptosis, otros genes encontrados tienen función en la apoptosis (caspasa 6, receptor del factor de necrosis tumoral, Inhibidor de promotor de gen del polipéptido ligera kappa en células B). Otros genes sobreexpresados encontrados (Heat shock 70, growth arrest and DNA-damage-inducible gamma, jun-D) tienen función celular en respuesta al estrés, la proteína Heat shock 70 previene la muerte celular mediante la inhibición de la agregación de proteínas celulares [32].

También se encontraron genes sobreexpresados pertenecientes a las histonas, las histonas forman un complejo con el DNA que resulta en la condensación de la cromatina de esta forma protege al DNA del daño por estrés oxidativo, se ha reportado que algunos fotosensibilizadores pueden dañar el DNA [88], por lo cual podemos suponer que nuestros tratamientos pudieran dañar el DNA, sin embargo Konishi y cols., encontraron que una histona H1 se traslocaba del núcleo al citoplasma donde inducía la liberación de citocromo C de la mitocondria y finalmente apoptosis [89].

Encontramos que otros genes de histonas también fueron alterados, por lo que es difícil decir si existe daño al DNA o se presenta el mecanismo propuesto por Konishi, para lo cual requerimos de más estudios, tanto en el estudio del daño sobre el DNA, como en la elucidación detallada de las funciones de las otras histonas.

Se encontraron genes sobreexpresados involucrados en la vía de señalización MAPK, estas enzimas son componentes críticos de una red de señalización celular que en última instancia regula la expresión génica en respuesta a estímulos extracelulares. Las tres familias de MAPK bien conocidas son: las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs por sus siglas en inglés), las proteínas quinasas c-Jun N-terminal quinasas activadas por estrés (JNKs/SAPKs), y la p38 MAPK. Cada una de estas enzimas es un objetivo para cascadas de fosforilación en el que la activación secuencial de tres quinasas constituye una vía de señalización común. Las proteínas JNK y p38 son mediadores clave de las señales de estrés y respuesta inflamatoria. La activación de la vía MAPK parece jugar un papel importante en la inducción de la apoptosis [90].

Otros genes sobreexpresados involucrados en la activación de la apoptosis son los genes de la vía de señalización del calcio, ya que se ha demostrado que el aumento del calcio intracelular liberado por el retículo endoplásmico y la mitocondria después del tratamiento con la TFD, está involucrado en la iniciación y el desarrollo de la apoptosis [90].

También se encontró la sobreexpresión del gen JunD protooncogen, la proteína de este gen interacciona con el complejo de factor de transcripción activador de proteína 1 (AP-1), AP 1 tiene función en respuesta al estrés, la diferenciación y la modulación de la apoptosis. Otras proteínas codificadas por los genes c-fos y c-jun, interaccionan con AP-1, se ha reportado la sobreexpresión de estos genes, esto en respuesta a la TFD [91].

La TFD produce un estrés oxidativo que puede resultar en la activación y translocación de factor nuclear kappa (NF-kB) al núcleo, una vez ahí se dirige a la sobreexpresión de genes involucrados en la inmunoregulación, proceso proinflamatorio, genes anti-apoptóticos y reguladores negativos de NF-kB. El mecanismo por el cual TFD induce la translocación de NF-kB al núcleo no está claro hasta el momento, pero el NF-kB proporciona una señal anti-apoptótica a las células expuestas a la PDT [80]. En este estudio se encontró el gen inhibidor de promotor de gen del polipéptido ligera kappa en células B sobreexpresado, evidencia de la activación del NF-kB. Otra vía importante en la respuesta al estrés, es sin duda la del metabolismo del glutatión (glutatión peroxidasa 4, 5, 7, entre otros), estas enzimas catalizan la reducción de H_2O_2 una especie reactiva de oxígeno que suele ser generada en la terapia fotodinámica [92].

El análisis de la expresión génica diferencial de los tratamientos con las metaloporfirinas sobre células SiHa, arrojó evidencia sobre la forma en la que la terapia fotodinámica actúa, por ejemplo induciendo la apoptosis vía genes de la familia Bcl-2, jun-D, receptor del ácido retinoico beta y la vía de señalización del receptor del factor de necrosis tumoral, también se observa el estrés oxidativo con la sobreexpresión de genes como heat shock 70, genes de histonas e inhibidor de NF-kB.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Se sintetizaron y purificaron cuatro porfirinas no simétricas del tipo A₃B: NS1u, NS2u, NS1uf y NS2uf. Dos de ellas funcionalizadas con glutamato (NS1uf y NS2uf).
- Se sintetizaron las metaloporfirinas correspondientes de cobre y zinc de las porfirinas.
- Se caracterizaron las metaloporfirinas y las porfirinas por espectrofotometría UV-Vis, Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Carbono 13.
- Las metaloporfirinas de zinc presentaron los valores más altos de rendimiento cuántico de oxígeno singlete y las metaloporfirinas de cobre presentaron los valores más bajos.
- La metaloporfirina NS2uf-Zn es la más citotóxica y la porfirina NS2u es la menos citotóxica.
- La funcionalización de las porfirinas con L-glutamato aumentó la actividad fototóxica.
- La metalación de las porfirinas con zinc aumentó su actividad fototóxica, mientras que la metalación de las porfirinas con cobre disminuyó su actividad fototóxica.
- Las metaloporfirinas NS1uf-Zn y NS2uf-Zn presentaron los mejores valores de IC₅₀ de actividad fototóxica 0.03 y < 0.01 μ M, respectivamente.
- Las porfirinas NS1uf, NS2uf, NS1uf-Zn y NS2uf-Zn indujeron apoptosis en las células SiHa.
- Los tratamientos con las metaloporfirinas NS2uf-Cu y NS2uf-Zn presentaron un patrón de expresión génica similar.

- Se encontraron genes sobreexpresados en el análisis de expresión génica diferencial implicados en la inducción de apoptosis y el estrés oxidativo.

DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

- Cartel: **Síntesis de tetrarilporfirinas no simétricas A₃B funcionalizadas con L-glutamato**. Eder Arredondo-Espinoza, Susana López-Cortina, Isaías Balderas-Rentería, Eugenio Hernández-Fernández. 9^a Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica.
- Artículo aceptado: **Synthesis of Unsymmetrical A₃B Tetraarilporphyrins Functionalized with L-glutamate and their Zn(II) and Cu(II) Metal Complex Derivatives**. Eder Arredondo-Espinoza, Susana López-Cortina, Isaías Balderas-Rentería, Eugenio Hernández-Fernández. *J. Mex. Chem. Soc.*

REFERENCIAS

1. Cooper, G., Hausman, R. La Célula, 1ª Ed. Marban Libros, S.L. ISBN: 84-7101-488-2. **2006.**
2. Gerald, K. Biología Celular y Molecular, Conceptos y Experimentos, 5ª Ed. Pág. 662-686. Mc Graw Hill. ISBN 13:978-970-10-6925-7. **2008.**
3. Organización Mundial de la Salud. “Cáncer”.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. (Consultado en Febrero **2014**).
4. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. “Cáncer”.
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf?s=inegi&c=2900&ep=149>. (Consultado en Febrero **2014**).
5. Hernández, M., y Ríos, M. Oncogenes y Cáncer. Revista Cubana Oncología. Vol. 15. No. 2. 131-139. **1999.**
6. Sherr, C. Principles of Tumor Suppression. Cell. Vol. 116. 235-246. **2004.**
7. Hernández, M., y Ríos, M., Los Genes Supresores de Tumores y el Cáncer. Revista Cubana de Oncología. Vol. 17. No. 1. 65-71. **2001.**
8. Michor, F., Iwasa, Y., y Nowak, M. Dynamics of cáncer. Nature Reviews Cancer. Vol. 4. 197-205. **2004.**
9. Mohandas, K., Genetic Predisposition to Cancer. Current Science. Vol. 81, No. 5. 482-489. **2001.**
10. Loeb, L., Loeb, K., y Anderson, J. Multiple Mutations and Cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 100. No. 3. 776-781. **2003.**

11. Paranjape, T., Slack, F., Weidhaas, J. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut*. Vol. 58. No. 11. 1546-1554. **2009**.
12. Esteller, M. Epigenetics in Cancer. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 358. 1148-1159. **2008**.
13. Komarova, N. y Wodarz, D. Drug resistance in cancer: Principles of emergence and prevention. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 102. No.27. 9714-9719. **2005**.
14. Igney, F. y Krammer, P. Death and Anti-Death: Tumor Resistance to Apoptosis. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 2. 277-288. **2002**.
15. Harley, C., Telomerase and Cancer Therapeutics. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 8. 167-179. **2008**.
16. Liizumi, M., Liu, W., Pai, S., Furuta, E. y Watabe, K. Drug development against metastasis-related genes and their pathways: A rationale for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 1786. No. 2. 87-104. **2008**.
17. Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. y Kojiro, M. Angiogenesis in Cancer. *Vascular Health and Risk Management*. Vol. 2. No. 3. 213-219. **2006**.
18. Gooderham, N., y Carmichael, P. Mechanisms of Chemical Carcinogenesis. *The Cancer Handbook 2nd Edition*. John Wiley & Sons, Ltd. **2007**.
19. Asociación Americana Contra el Cáncer. E.U.A.
<http://www.cancer.org/Espanol/cancer/Queesloquecausaelcancer/Otrosagentescancerigenos/la-exposicion-a-la-radiacion-y-el-cancer>. (Consultado en febrero **2014**).

20. De Gruijl, F. UV Radiation, DNA Damage, Mutations and Skin Cancer. Environmental UV Radiation: Impact on Ecosystems and Human Health and Predictive Model. Vol. 57. 249-258. **2006**.
21. Asociación Americana Contra el Cáncer. E.U.A.
<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002782-pdf.pdf>. (Consultado en febrero **2014**).
22. McLaughlin-Drubin, M., y Munger, K. Viruses Associated with Human Cancer. Biochim Biophys Acta. Vol. 1782. No. 3. 127-150. **2008**.
23. Martínez, E., y Pérez, C. Influencia de la edad en el desarrollo del cáncer. RECVET. Vol. 2. 1-4. **2007**.
24. Instituto Nacional Del Cáncer. E.U.A.
<http://www.cancer.gov/espanol/tipos/necesita-saber/cancer/page8>.
(Consultado en febrero **2014**).
25. Benedí, J. y Gómez, M., Fármacos Antineoplásicos I. Farmacia Profesional. Vol. 20. No. 2. **2006**.
26. Torpy, J. Radioterapia. The Journal of the American Medical Association. Vol. 294. No. 10. 60-64. **2005**.
27. Asociación Americana Contra el Cáncer. E.U.A.
<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003022-pdf.pdf>. (Consultado en febrero **2014**).
28. Murphy, J. Trends in Cancer Immunotherapy. Clinical Medicine Insights: Oncology. Vol. 4. 67-80. **2010**.

29. Zhu T., y Finlay J. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical Physics*. Vol. 35. No. 7. 3127-3136. **2008**.
30. Cheng-Liang P., Ping-Shan L. y Ming-Jium S. Influence of substitutions in asymmetric porphyrins on intracellular uptake, subcellular localization and phototoxicity in hela cells. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications (BME)*. Vol. 20. No. 1. 9-17. **2008**.
31. O'Connor A., Gallagher W. y Byrne A. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. Vol. 85. 1053-1074. **2009**.
32. Castano A., Mroz P. y Hamblin M. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Review Cancer*. Vol. 6. No. 7. 535-545. **2006**.
33. Price M., Reiners J., Santiago A. y Kessel D. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochemical Photobiology*. Vol. 85. No.5. 1177-1181. **2009**.
34. Macdonald I. y Doguerty T. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. Vol. 5. 105-129. **2000**.
35. Agostinis P., et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *American Cancer Society*. Vol. 61. 250-281. **2011**.
36. Milgrom L. R. *The Colours of Life*; Oxford University Press, **1997**.
37. Králová J., Bříza T., Moserová I., Dolenský B., Vašek P., Poučkova P., Kejik Z., Kaplanek R., Martasek P., Dvořak M., Kral V. Glycol Porphyrin

Derivatives as Potent Photodynamic Inducers of Apoptosis in Tumor Cells. *Journal Medicinal Chemistry*. Vol. 51. 5964-5973. **2008**.

- 38.** Borbas K.E., Chandrashaker V., Muthiah C., Kee H.L., Holten D., Lindsey J. Design, Synthesis, and Photophysical Characterization of Water-Soluble Chlorins. *Journal Organic Chemistry*. Vol. 73. 3145-3158. **2008**.
- 39.** Lau J.T., Lou P.C., Fong W.P., Ng D. A Zinc(II) Phthalocyanine Conjugated with an Oxaliplatin Derivative for Dual Chemo- and Photodynamic Therapy. *Journal Medicinal Chemistry*. Vol. 55. 5446-5454. **2012**.
- 40.** Saboktakin M.R., Tabatabaei R.M., Maharramov A., Ramazanov M.A. Synthesis and in vitro studies of biodegradable modified chitosan nanoparticles for photodynamic treatment of cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 49. 1059-1065. **2011**.
- 41.** Nawalany K., Rusin A., Kepczynski, M., Filipczak, P., Kumorek M., Kozik B., Weitman H., Ehrenberg B., Krawczyk Z., Nowakowska M. Novel nanostructural photosensitizers for photodynamic therapy: In vitro studies. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 430. 129-140. **2012**.
- 42.** Schwartz S., Abolon K., Vermund H. Some relationships of porphyrins, X-rays and tumors. *Univ. Minn. Med. Bull*. Vol. 27. 7-8. **1955**.
- 43.** Lipson R., Baldes E. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch Dermatol*. Vol 82. 508-516. **1960**.
- 44.** Diamond I., Granelli S., McDonagh A., Nielsen S., Wilson C., Jaenicke R. Photodynamic therapy of malignant tumors. *Lancet*. Vol. 2. 1175-1177. **1972**.

45. Kelly J., Snell M. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. J. Urol. Vol. 115. 150-151. **1976.**
46. Weishaupt K., Gomer C., Dougherty T. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. Cancer Res. Vol. 36. 2326-2329. **1976.**
47. Dougherty T., Kaufman J., Goldfarb A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Res. Vol. 38. 2628-2635. **1978.**
48. McCaughan J., Guy J., Hawley P. Hematoporphyrinderivative and photoradiation therapy of malignant tumors. Lasers Surg. Med. Vol. 3. 199-209. **1983.**
49. McCaughan J., Hicks W., Laufman L. Palliation of esophageal malignancy with photoradiation therapy. Cancer. Vol. 54. 2905-2910. **1984.**
50. Banfi S., Carusco E., Caprioli S., Mazzagatti L., Canti G., Ravizza R., Garibaldi M. y Monti E. Photodynamic Effects of porphyrin and clorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma Cells. Bio-organic & Medical Chemistry. Vol. 12. 4853-4860. **2004.**
51. Banfi S., Caruso E., Buccafurni L. y Murano, R. Comparison between 5,10,15,20-tetraaryl- and 5,15-diarylporphyrins as photosensitizers: synthesis, photodynamic activity, and quantitative structure-activity relationship modeling. J. Med. Chem. Vol. 49. 3293-3304. **2006.**
52. Jofensen L., y Boyle R., Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitizers. Metal Based Drugs. Vol. 10. 1-24. **2008.**

- 53.** Lindsey J., Schreiman I., Hsu H., Kearney P., Marguerettaz A. "Rothemund and Adler-Longo Reactions Revisited: Synthesis of Tetraphenylporphyrins under Equilibrium Conditions," *Journal Organic Chemtry*. Vol. 52. No. 5. 827-836. **1987**.
- 54.** Bonnett R., McGarvey D.J., Harriman A., Land E.J., Truscott T.G., Winfield U. Photophysical properties of meso-tetraphenylporphyrin and meso-tetra (hydroxyphenyl) porphyrins. *J. Photochem. Photobiol*. Vol. 48, 271-276. **1988**.
- 55.** Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. Vol. 72. 248-254. **1976**.
- 56.** Flores H., Riveros R., Sosa P., Vázquez C. Microarreglos de DNA. *Mensaje Bioquímico*. Vol. 27. 97-120. **2003**.
- 57.** Chomczynski P., Sacchi N. Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. Vol. 162. 156-159. **1987**.
- 58.** Miranda J., Bringas R. Análisis de datos de microarreglos de ADN. Parte II: Cuantificación y análisis de la expresión génica. *Biotecnología Aplicada*. Vol. 25. 5117-5125. **2008**.
- 59.** Huang D., Sherman B., Lempicki R. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc*. Vol. 4. 1-43. **2009**.

60. MacMahon S., Fong II. R., Baran P., Safonov I., Wilson S., Schuster D.
Synthetic Approaches to a Variety of Covalently Linked Porphyrin-
Fullerene Hybrids. *J. Org. Chem.* Vol 66. 5449-5455. **2001.**
61. Jones S.M., Urch J.E., Kaiser M., Bru, R., Harwood J.L., Berry C., Gilbert I.H.
Analogues of Thiolactomycin as Potential Antimalarial Agents. *J. Med.*
Chem. Vol. 48. 5932-5941. **2005.**
62. Pushpan S.K. Venkatraman S. Anand V.G., Sankar J., Parmeswaran D., Ganesan
S., Chandrashekar T.K. Porphyrins in Photodynamic Therapy - A Search
for Ideal Photosensitizers. *Curr. Med. Chem. - Anti. Cancer Agent.* Vol.
2. 187-207. **2002.**
63. Pandey S.K., Zheng X., Morgan J., Missert J.R., Liu T.H., Shibata M., Bellnier
D.A., Oseroff A.R., Henderson, B.W., Dougherty T.J. Pandey R.K.
Purpurinimide Carbohydrate Conjugates: Effect of the Position of the
Carbohydrate Moiety in Photosensitizing Efficacy. *Mol. Pharm* vol. 4.
448-464. **2007.**
64. Zheng G., Graham A., Shibata M., Missert J.R., Oseroff A.R., Dougherty T.J.,
Pandey R.K. Synthesis of beta-Galactose-Conjugated Chlorins Derived
by Enyne Metathesis as Galectin-Specific Photosensitizers for
Photodynamic Therapy *J. Org. Chem.* Vol. 66. 8709-8716. **2001.**
65. Stefflova K., Li H., Chen J., Zheng G. Peptide-based pharmacomodulation of a
cancer-targeted optical imaging and photodynamic therapy agent
Bioconjug. Chem. Vol. 18. 379-388. **2007.**

66. Taima H., Okubo A., Yoshioka N., Inoue H. Synthesis of cationic water-soluble esters of chlorin e6. *Tetrahedron Lett.* Vol. 46. 4161-4164. **2005**.
67. Garcia G., So, V., Lamarche F., Granet R., Guilloton M., Champavier Y., Krausz P. Synthesis and photocytotoxic activity of new chlorin–polyamine conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* Vol.16. 3118-3192. **2006**.
68. Leo A., Hansch C., Elkins D. Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews.* Vol. 71. 525-616. **1971**.
69. Mamardashvili N., Golubchikov O. Spectral properties of porphyrins and their precursors and derivatives. *Russian Chemical Reviews.* Vol. 70. 577-606. **2001**.
70. Loredó Calderón E., Martínez Leija C., López Cortina S., Jiménez Pérez V., Hernández Fernández E., Cuevas Yañez E. "One pot" Microwave assisted synthesis of 5,10,15-Tri(4-Methoxyphenyl)-20-(4-Chlorophenyl)-21H,23H-Porphyrin and its Zinc (II) Complex. *Química Hoy.* Vol. 2. 6-9. **2012**.
71. Nifiatis F., Athas J.C., Gunaratne K.D., Gurung Y., Monette K.M., Shivokevich P.J. Substituent Effects of Porphyrin on Singlet Oxygen Generation Quantum Yields. *The Open Spectroscopy Journal.* Vol. 5. 1-12. **2011**.
72. Venkatesan R., Periasamy N., Srivastava T. Singlet molecular oxygen quantum yield measurements of some porphyrins and metalloporphyrins. *Prec. Indian Acad. Sci.* Vol. 104. 713-722. 131-140. **1992**.

73. Ogunsipe A., Maree D., Nyokong T. Solvent effects on the photochemical and fluorescence properties of zinc phthalocyanine derivatives. *Journal of Molecular Structure*. Vol. 650. **2003**.
74. Barnajje S., Prasad P., Hussain A., Khan I., Kondaiah P., Chakravarty A. Remarkable photocytotoxicity of curcumin in HeLa cells in visible light and arresting its degradation on oxovanadium(IV) complex formation. *R. Chem. Commun.* Vol. 48. 7702-7704. **2012**.
75. Laville I., Pigaglio S., Blais J., Doz F., Looock B., Maillard P., Grierson D., Blais J. Photodynamic Efficiency of Diethylene Glycol-Linked Glycoconjugated Porphyrins in Human Retinoblastoma Cells. *J. Med. Chem.* Vol. 49. 2558-2567. **2006**.
76. Shabani F., Ghammamy S. Synthesis, characterization and anti-tumour activity of VOF₃ and Cu (II) porphyrine complexes. *Der Pharma Chemica*. Vol.1. 124-129. **2009**.
77. Tovmasyana A., Babayanb N., Sahakyana L., Shahkhatunid A., Gasparyanb G., Aroutiounianb R., Ghazaryan R. Synthesis and in vitro anticancer activity of water-soluble cationic pyridylporphyrins and their metallocomplexes. *J. Porphyrins Phthalocyanines*. Vol. 12. 1100-1110. **2008**.
78. Szurko A., Krämer-Marek G., Widel M., Ratuszna A., Habdas J., Kuś P. Photodynamic effects of two water soluble porphyrins evaluated on human malignant melanoma cells *in vitro*. *Acta Biochim. Pol.* Vol. 50. 1165-1174. **2003**.

79. Wawrzynska M., Kałas W., Biały D., Ziolo E., Arkowski J., Mazurek W., Strzadala L. In Vitro Photodynamic Therapy with Chlorin e6 Leads to Apoptosis of Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* Vol. 58. 65-75. **2010**.
80. Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G. B., Hamblin M. R. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers.* Vol. 3. 2516-2539. **2011**.
81. Inoue K., Fukuhara H., Kurabayashi A., Furihata M., Tsuda M., Nagakawa K., Fujita H., Utsumi K. Shuin T. Photodynamic therapy involves an antiangiogenic mechanism and is enhanced by ferrochelatase inhibitor in urothelial carcinoma. *Cancer Sci.* Vol. 104, **2013**.
82. Tochigi M., Inoue T., Suzuki-Karasaki M., Ochiai T., Ra C., Suzuki-Karasaki Y. Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation. *Int. J. Oncol.* Vol. 42. 765-772. **2013**.
83. Rapozzi V., Pietra E. D., Zorzet S., Zacchigna M., Bonavida B., Xodo L. E. Nitric oxide-mediated activity in anti-cancer photodynamic therapy. *Nitric Oxide.* Vol. 30. 26-35**2013**.
84. Kessel D. Death pathways associated with photodynamic therapy. *Med. Laser Appl.* Vol. 21. 219-224. **2006**.
85. Castano A. P., Demidovaa T. N., Hamblin M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagn. Photodyn.* Vol. 2. 1-23. **2005**.

86. Miki Y., Akimoto J., Yokoyama S., Homma, T., Tsutsumi M., Haraoka J., Hirano K., Beppua M. Photodynamic Therapy in Combination with Talaporfin Sodium Induces Mitochondrial Apoptotic Cell Death Accompanied with Necrosis in Glioma Cells. *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 36. 215-221. **2013.**
87. Garg A., Nowis D., Golab J., Agostinis P. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. *Apoptosis.* Vol. 15. 1050-1071. **2010.**
88. Cekaite L., Peng Q., Reiner A., Shahzidi S., Tveito S., Furre I., Hovig E. Mapping of oxidative stress responses of human tumor cells following photodynamic therapy using hexaminolevulinate. *BMC Genomics.* Vol. 8. 1-20. **2007.**
89. Konishi A., Shimizu S., Hirota J., Takao T., Fan Y., Matsuoka Y., Zhang L., Yoneda Y., Fujii Y., Skoultchi A., Tsujimoto Y. Involvement of Histone H1.2 in Apoptosis Induced by DNA Double-Strand Breaks. *Cell.* Vol. 114. 673-688. **2003.**
90. Moserova I., Kralova J. Role of ER Stress Response in Photodynamic Therapy: ROS Generated in Different Subcellular Compartments Trigger Diverse Cell Death Pathways. *Plos one.* Vol. 7. 1-16. **2012.**
91. Wild P., Krieg R., Seidl J., *et al.* RNA expression profiling of normal and tumor cells following photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid–induced protoporphyrin IX *in vitro*. *Mol Cancer Ther.* Vol. 4. 516-528. **2005.**

- 92.** Cisneros E., Pupo J., Céspedes E. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutación peroxidasa. Rev Cubana Invest Bioméd. Vol. 16. 10-15. **1997**.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO



Eder Ubaldo Arredondo Espinoza

Candidato para el grado de:

Doctor en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: Síntesis de porfirinas y metaloporfirinas no simétricas funcionalizadas con l-glutamato y evaluación de sus propiedades fotodinámicas y anticancerígenas.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos personales: nacido en Monterrey, N.L., el 21 de Julio de 1987, hijo de Enrique David Arredondo Moreno y Martha Elena Espinoza Costilla, Casado con Mónica Loera López.

Educación: egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grados obtenidos: Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo en 2008 y Maestría en Ciencias con otn., en Farmacia en 2011.